

ANA PAULA CUNHA NORTE

**Análise da diversidade genética e resistência antimicrobiana de
isolados de *Streptococcus dysgalactiae* de origem animal**

São Paulo

2023

ANA PAULA CUNHA NORTE

**Análise da diversidade genética e resistência antimicrobiana de
isolados de *Streptococcus dysgalactiae* de origem animal**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e
Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

Norte, Ana Paula Cunha

Análise da diversidade genética e resistência antimicrobiana de isolados de *Streptococcus dysgalactiae* de origem animal / Ana Paula Cunha Norte ; orientadora Andrea Micke Moreno. – São Paulo, 2023.

104 f. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

1. *Streptococcus dysgalactiae*. 2. AFLP. 3. CIM. 4. Suínos. 5. Bovinos. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de causas de mortalidade em matrizes de um sistema de produção intensiva de suínos.", protocolada sob o CEUA nº 9465041119 (ID 007324), sob a responsabilidade de **Andrea Micke Moreno e equipe**; que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/12/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of mortality causes in swine females in an intensive production system.", utilizing 150 Swines (150 females), protocol number CEUA 9465041119 (ID 007324), under the responsibility of **Andrea Micke Moreno and team**; - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/17/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [12/2019](#) a [12/2021](#)

Área: [Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Suínos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [1 a 4 anos](#)

N: [150](#)

Linhagem: [Linhagem comercial](#)

Peso: [200 a 300 kg](#)

Local do experimento: Animais serão avaliados na granja de origem, nas salas de gestação e maternidade

São Paulo, 10 de fevereiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NORTE, Ana Paula Cunha.

Título: **Análise da diversidade genética e resistência antimicrobiana de isolados de *Streptococcus dysgalactiae* de origem animal.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, por ter me acolhido em um momento importante da minha vida. Agradeço pela oportunidade de voltar à vida acadêmica e pelo carinho, sinceridade e apoio durante todo o período do mestrado e que se repercute também além dele. Ela é um exemplo de profissional dedicada que trata a todos com imenso respeito e igualdade.

À minha coorientadora Dra. Luiza Zanolli Moreno, por todo o conhecimento técnico passado e pelas dicas valiosas.

Aos técnicos de laboratório, Alexandre, Ana Paula, Rosilma e D. Rose, que logo se tornaram bons amigos e são ótimos profissionais que exercem suas atividades com total conhecimento e maestria.

Aos meus colegas de laboratório e de pesquisa, Ivan, Reinaldo, Kawany e Felipe, por compartilharem conhecimento, preocupações e risadas. Foi uma alegria dividir o dia a dia com vocês e desejar sucesso a todos.

Aos doutores André Pegoraro Poor e Beatriz Parra, que antes de partirem me ensinaram diversos protocolos importantes com muito zelo e carinho.

Ao mestre Matheus Saliba Monteiro, pela valiosa troca de informações e ensinamentos.

Às minhas amigas da veterinária, Bruna, Izabel, Ariane e Marina, que sempre me apoiaram durante o mestrado e me incentivaram dia a dia a seguir firme em busca dos meus objetivos sempre com muita alegria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicado às Zoonoses e à Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) por todo o apoio dado durante o período. Aos professores, pós-graduandos e funcionários do departamento que fizeram parte deste período importante da minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de

Financiamento 001. Gostaria de agradecer à CAPES pela bolsa que possibilitou o desenvolvimento deste projeto e o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Programa PAE e especificamente ao projeto “Mães Pesquisadoras” pela valorosa iniciativa de apoiar a maternidade na pós-graduação.

À minha mãe, Fátima, pai, Antônio, e irmãs, Ana Carolina e Ana Luísa, por serem sempre um ombro amigo e conselheiro.

Aos meus tios, Antônio Carlos e Carmélia, que amam a criação de suínos e vibram com todas as minhas conquistas. Agradeço muito pelo carinho que vocês sempre tiveram comigo.

Ao meu marido, Erick, meu porto seguro, meu melhor amigo e conselheiro.

Ao meu filho, João Vicente, por encher a minha vida de amor. Isso é para você e por você.

RESUMO

NORTE, A. P. C. **Análise da diversidade genética e resistência antimicrobiana de isolados de *Streptococcus dysgalactiae* de origem animal.** [Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Streptococcus dysgalactiae* isolates from animal origin]. 2023. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

Streptococcus dysgalactiae é uma bactéria comensal de animais e humanos que causa uma variedade de infecções oportunistas. Há poucos estudos que caracterizam esse agente de potencial zoonótico no Brasil. Os objetivos do presente estudo foram caracterizar por métodos fenotípicos e genotípicos 92 estirpes de *S. dysgalactiae* isoladas de bovinos com quadros clínicos de metrite, mastite e pododermatite e de suínos com metrite, pneumonia, abscessos e artrite, provenientes de diferentes estados brasileiros. As estirpes foram isoladas entre os anos de 2015 e 2019 e foram identificadas pela espectrometria de massa MALDI TOF e pela reação em cadeia pela polimerase. Posteriormente foi feita a genotipagem por polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e a determinação do perfil de resistência por microdiluição em caldo. Pelo AFLP foram identificados 18 perfis genotípicos que formaram dois grupamentos principais discriminando as estirpes segundo o hospedeiro (bovino e suíno). Enquanto as estirpes de origem bovina foram reunidas de acordo com o rebanho, as estirpes suínas tiveram alta heterogeneidade dentro do mesmo rebanho. A partir dos resultados de concentração inibitória mínima (CIM) foram identificados dez perfis de resistência para as estirpes bovinas e vinte e nove perfis de resistência para as estirpes suínas. Não foi identificada uma correlação entre os perfis de resistência antimicrobiana e os perfis genotípicos. Todas as estirpes suínas foram resistentes à doxiciclina, oxitetraciclina e clindamicina, além de terem altas taxas de resistência aos macrolídeos, à tiamulina, à espectinomicina e à neomicina. Das estirpes bovinas, 62,8% foram resistentes à neomicina, 34,9% à gentamicina, e 25,6% à oxitetraciclina. Todas as estirpes do estudo foram sensíveis ao ceftiofur e apenas uma estirpe bovina foi resistente à ampicilina e penicilina. Portanto, os beta-lactâmicos são a classe de antimicrobianos de escolha para o tratamento da infecção em ambas as espécies. As estirpes de origem suína apresentaram 100% de multirresistência e as estirpes de origem bovina apenas 14%. Tendo em vista a discriminação genotípica das estirpes e as diferenças nos padrões de resistência, é provável que os isolados avaliados sejam pertencentes a subespécies diferentes. Os altos níveis de multirresistência observadas nas estirpes de suínos indica a importância do monitoramento desta espécie nos rebanhos para evitar a disseminação de linhagens multirresistentes e de potencial zoonótico.

Palavras-chave: *Streptococcus dysgalactiae*. AFLP. CIM. Suínos. Bovinos.

ABSTRACT

NORTE, A. P. C. **Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Streptococcus dysgalactiae* isolates from animal origin.** [Análise da diversidade genética e resistência antimicrobiana de isolados de *Streptococcus dysgalactiae* de origem animal]. 2023. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

Streptococcus dysgalactiae is a commensal bacterium of animals and humans that causes a range of infectious diseases. Despite its zoonotic potential, few studies in Brazil have characterized this specie. The aim of this study is to characterize phenotypically and genotypically 92 *Streptococcus dysgalactiae* strains from bovine and swine origins. These strains were isolated from clinical cases of bovine metritis, mastitis, pododermatitis, swine metritis, pneumonia, abscess, and arthritis. They were isolated from 2015 to 2019 in different Brazilian states and identified by mass spectrometry MALDI TOF and PCR. Afterward, genotyping by amplified fragment length polymorphism (AFLP) was performed. Antimicrobial resistance profiling was determined by microdilution broth and minimal inhibitory concentration was determined. Eighteen genotypic profiles were identified and clustered according to host species (swine and bovine). While bovine strains clustered at the farm level, swine strains showed high heterogeneity intra and inter-farms. Minimal inhibitory concentration resulted in ten bovine antimicrobial resistance profiles and twenty-nine swine antimicrobial resistance profiles. There was no correlation between genotypic and antimicrobial resistance profiles. All swine isolates were resistant to doxycycline, oxytetracycline, and clindamycin, and showed high MIC values for macrolides, tiamulin, spectinomycin, and neomycin. Bovine isolates had high MIC values for neomycin (62.8%) and intermediate values for gentamycin (34.9%) and oxytetracycline (25.6%). All isolates were susceptible to ceftiofur and only one isolate was resistant to ampicillin and penicillin. Therefore, beta-lactams are the best choice of treatment for both species. All swine isolates were multiresistant, as opposed to 14% of bovine isolates. Due to genotypic profiles and antimicrobial resistance patterns, it is likely that the isolates are from different subspecies. The high resistance rates observed especially in the swine isolates indicate the importance of species farm monitoring to avoid dissemination of multiresistant strains of zoonotic potential.

Keywords: *Streptococcus dysgalactiae*. AFLP. MIC. Swine. Bovine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema de distribuição dos antimicrobianos no painel utilizado para a realização da microdiluição em caldo39
- Figura 2 - Placa de ágar sangue com crescimento de estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* beta-hemolítico do lado esquerdo e alfa-hemolítico do lado direito.....44
- Figura 3 – Dendrograma ilustrando as relações entre os perfis de restrição de *Streptococcus dysgalactiae* pela técnica do AFLP.....47
- Figura 4 – Dendrograma correlacionando os genótipos de AFLP dos isolados de *Streptococcus dysgalactiae* com a concentração inibitória mínima.....48
- Figura 5 – Dendrograma ilustrando as relações entre as concentrações inibitórias mínimas das estirpes de *Streptococcus dysgalactiae*.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para identificação da espécie <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	37
Tabela 2 – Concentração de antimicrobianos testados, amplitude e pontos de corte empregados para classificação dos resultados obtidos	40
Tabela 3 – Distribuição das estirpes avaliadas segundo a espécie animal de origem.....	42
Tabela 4 – Distribuição das estirpes avaliadas de acordo com o Estado de origem.....	43
Tabela 5 – Distribuição das estirpes avaliadas segundo o ano de isolamento.....	43
Tabela 6 – Tipo de hemólise observada nas estirpes de acordo com a origem.....	43
Tabela 7 – Frequência das estirpes estudadas de acordo com o sítio de isolamento.....	45
Tabela 8 – Distribuição das estirpes de <i>S. dysgalactiae</i> de origem bovina segundo os valores de CIM 50 e CIM 90, e frequência de resistência identificadas.....	51
Tabela 9 – Distribuição das estirpes de <i>S. dysgalactiae</i> de origem suína segundo os valores de CIM 50 e CIM 90, e frequência de resistência identificadas.....	52

Tabela 10 – Comparação entre as taxas de resistência de <i>S. dysgalactiae</i> isoladas de bovinos e suínos frente aos antimicrobianos testados.....	54
Tabela 11 – Distribuição das estirpes estudadas segundo origem de isolamento e o número de classes de antimicrobianos as quais se observou resistência.....	54
Tabela 12 – Perfis de resistência antimicrobiana das estirpes de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> de origem bovina.....	57
Tabela 13 – Perfis de resistência antimicrobiana das estirpes de <i>Streptococcus dysgalactiae</i> de origem suína.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Taxas de resistência observadas nas estirpes de *S. dysgalactiae* isoladas de suínos e bovinos frente aos antimicrobianos testados.....50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 ESTREPTOCOCOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	17
2.2 <i>STREPTOCOCUS DYSGALACTIAE</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS E SUBESPÉCIES	22
2.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>S. DYSGALACTIAE</i>	27
2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE <i>S. DYSGALACTIAE</i>	32
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 ISOLADOS BACTERIANOS	34
4.2 IDENTIFICAÇÃO PELO MALDI TOF MS	35
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	36
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	36
4.5 GENOTIPAGEM POR POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)	37
4.6 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	38
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	42
5.2 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP).....	45
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	49
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

Streptococcus dysgalactiae é uma bactéria comensal de animais e humanos que causa uma grande variedade de infecções oportunistas. Atualmente considerado um patógeno humano emergente, ele causa desde infecções de pele até septicemia e acometimento de diversos órgãos e sistemas, como artrite, meningite, endocardite e pneumonia. Em humanos, pode levar à síndrome do choque tóxico e óbito, principalmente em pacientes com comorbidades e imunossuprimidos (BRANDEN; SPELLENBERG, 2009). Em animais, ele é conhecido agente etiológico de mastite “ambiental” em vacas de leite (WENTE; KROMKER, 2020) e de septicemia e alta mortalidade em peixes (ABDELSALAM; CHEN; YOSHIDA, 2009). Além disso, causa artrite, meningite e endocardite em leitões na maternidade (GOTTSCHALK; SEGURA, 2019) e formação de abscessos e doença tipo-garrotinho em equinos (TIMONEY, 2004). Há relatos de casos em outras espécies, o que demonstra a grande variabilidade de hospedeiros acometidos.

Apesar de estirpes da espécie possuírem propriedades bioquímicas e genotípicas muito semelhantes, há grande variabilidade também na classificação da espécie pelo agrupamento sorológico de Lancefield e pelo tipo de hemólise produzida pela colônia bacteriana em ágar sangue de cordeiro ou bovino (BERT *et al.*, 1997). Ademais, VANDAMME *et al.* propôs em 1996 a divisão da espécie nas subespécies *dysgalactiae* e *equisimilis*, em que a primeira se refere aos isolados de animais dos grupos C ou L de Lancefield que são alfa, beta e gama-hemolíticos; enquanto a segunda se refere aos isolados humanos dos grupos C ou G de Lancefield que são beta-hemolíticos. Entretanto, essa divisão não é

totalmente compreendida pela literatura e as definições taxonômicas e de nomenclatura da espécie e subespécies são controversas.

Recentemente, encontrou-se evidências importantes do potencial zoonótico do *Streptococcus dysgalactiae*. Enquanto a subespécie *dysgalactiae* causa infecções humanas não-invasivas e esporádicas adquiridas pela manipulação de carne e peixe crus (KOH; RAHMAN; SESSIONS, 2020), a subespécie *equisimilis* causa infecções invasivas por transmissão direta (TORRES *et al.*, 2007) e indireta (SILVA *et al.*, 2015). A habilidade da bactéria se adaptar a diferentes ambientes está ligada à variabilidade genética e transferência horizontal de genes, como genes codificadores de fatores de virulência e de resistência antimicrobiana (MCNEILLY; MCMILLAN, 2014).

Por fim, há pouco estudos em suínos que abordem os estreptococos além do *Streptococcus suis*, e há poucos trabalhos em bovinos de leite que abordem as características genotípicas e fenotípicas desta espécie no Brasil. Portanto, estudos epidemiológicos e de resistência antimicrobiana de estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* são prioritários para evitar o surgimento e disseminação de linhagens patogênicas e multirresistentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estreptococos: características gerais

De acordo com o *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN), em 2023 existem 181 espécies e 31 subespécies de estreptococos. A primeira descrição de uma infecção por *Streptococcus* foi feita em 1874 por Theodor Billroth de casos de erisipela e infecções de pele; ao microscópio, eram organismos pequenos isolados ou achados em pares ou cadeias. Louis Pasteur, em 1879, isolou a bactéria e demonstrou ser esse o agente etiológico da febre puerperal causando mortalidade em mulheres e neonatos. Por fim, Friederich Julius Rosenbach, em 1884, isolou o agente de lesões supurativas e a espécie foi nomeada *Streptococcus pyogenes* (FERRETTI; KOHLER, 2016).

O gênero *Streptococcus* é bastante diverso e a sua interação com o hospedeiro tanto humano como animal varia entre a comensalidade, oportunismo e a patogenicidade (HAENNI; LUPO; MADEC, 2018). Essas bactérias são parte da microbiota da cavidade oral, pele, trato respiratório e trato reprodutivo de humanos (ARMISTEAD *et al.*, 2019; REYNOSO-GARCIA *et al.*, 2022; SANTACROCE *et al.*, 2020; VERMA; GARG; DUBEY, 2018) e são transmitidos pelo leite materno (LI *et al.*, 2022). Em animais, os estreptococos são habitantes comuns da cavidade nasal, tonsilas, trato reprodutivo e gastrointestinal de suínos (GOTTSCHALK; SEGURA, 2019; POOR *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2022); do trato reprodutivo, respiratório e do leite de vacas (BECKER *et al.*, 2023; LIMA; BICALHO; BICALHO, 2019; STEINBERG *et al.*, 2022), do trato respiratório, gastrointestinal e reprodutivo de equinos (BARBA *et*

al., 2020; CHAUCHEYRAS-DURAND *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2021) e do trato respiratório superior, intestinal e gênito-urinário de cães (LAMM *et al.*, 2010).

Os estreptococos são bactérias em sua maioria anaeróbias facultativas, catalase negativas, oxidase negativas e não móveis (TIMONEY, 1999). Elas também não formam esporos e são fermentadoras de carboidratos com produção de ácido láctico (KILLIAN, 2012). Possuem crescimento fastidioso, isto é, necessitam de meios de cultivo enriquecidos com soro ou sangue para seu crescimento (QUINN *et al.*, 2019). A maioria das bactérias Gram positivas possui uma parede celular composta de um peptidoglicano de estrutura conservada e glicopolímeros que variam de acordo com a espécie e a cepa (KOHLENER *et al.*, 2009). Os estreptococos possuem uma parede celular formada por camadas de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, em que se fixa carboidratos, ácidos teicóicos e lipoproteínas (PROCOP *et al.*, 2017). Essas proteínas de superfície possuem diferentes funções, como manutenção da integridade celular, proteção, formação de biofilme e interação com a célula do hospedeiro (KOHLENER *et al.*, 2009). Ademais, algumas cepas possuem uma cápsula hidrofílica de ácido hialurônico, um polímero formado por N-acetilglucosamina e ácido glucurônico, ou de polissacarídeo (TIMONEY, 2004).

O genoma dos membros do gênero *Streptococcus* apresentou grande perda e ganho de genes durante a evolução das espécies e cepas, com recombinação do genoma core e seleção positiva na diferenciação de espécies (LEFEBURE; STANHOPE, 2007). Isso resultou em invasão de tecidos específicos por certas espécies como *Streptococcus equi* em tonsilas de equinos, *Streptococcus suis* em tonsilas de suínos e *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae* em glândula mamária de ruminantes (TIMONEY, 2010). Um quarto do seu genoma

consiste em material exógeno ou móvel, como transposons e plasmídeos (ALVES-BARROCO *et al.*, 2021), portanto, a diversidade genética advém da transferência horizontal de material genético, que carrega genes de resistência antimicrobiana e de fatores de virulência, por exemplo (MCNEILLY; MCMILLAN, 2014).

A virulência deste gênero é baseada nas proteínas de superfície e estruturas que impedem a fagocitose, induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, levam à adesão celular e alteram o metabolismo de carboidratos (TIMONEY, 2010). A cápsula de ácido hialurônico, exotoxinas e proteína M (PATTERSON, 1996) são fatores de virulência bem conhecidos. A cápsula e a proteína M são antifagocíticas (TIMONEY, 1999), e a proteína M também é importante fator de aderência (ASBAUGH *et al.*, 1998). A maioria dos estreptococos patogênicos também possui diversas enzimas como hemolisinas, estreptolisina O e especialmente estreptolisina S, e a capacidade de ligação com os componentes do plasma do hospedeiro, como albumina e imunoglobulinas, o que permite o escape do sistema imune e evita a opsonização da bactéria (TIMONEY, 2010).

A análise sorológica pela aglutinação em látex para detecção do tipo de carboidrato C presente na parede celular identifica o grupo de Lancefield. Existem vinte grupos designados por letras de A à H e K a V. Essa divisão auxilia na distinção de grupos de estreptococos beta-hemolíticos patogênicos formados por cepas de origem humana ou de origem animal (LANCEFIELD, 1933). Os grupos mais associados às doenças humanas são os estreptococos dos grupos A, B, C, D e G (HASLAM, ST. GEME III, 2018). Os estreptococos do grupo A são conhecidos patógenos humanos, sendo o *Streptococcus pyogenes* o mais prevalente. Essa bactéria beta-hemolítica causa infecções supurativas agudas

como faringoamigdalites em crianças e infecções de pele (celulite, impetigo e erisipela) que podem evoluir para fasciíte necrozante e complicações como febre reumática, nefrite glomerular e síndrome do choque tóxico (CUNNINGHAM, 2000). Os grupos B, C, D, E, G, L, U e V estão relacionados aos estreptococos piogênicos que causam infecções supurativas em diversos hospedeiros (TIMONEY, 2010).

Outro agrupamento sorológico dos estreptococos é baseado na proteína de superfície M. Essa tipagem auxilia na identificação de *S. pyogenes* em estudos epidemiológicos (MCGREGOR *et al.*, 2004) e na identificação de outros estreptococos do grupo A de Lancefield (BEACHEY *et al.*, 1981) juntamente com o antígeno T (JOHNSON; KAPLAN, 1995). Mais de 80 sorotipos já foram identificados por esse método (CUNNINGHAM, 2000). Porém, como esse método é demorado e custoso pela necessidade de muitos reagentes, a tipagem também pode ser feita com o sequenciamento do gene *emm*, que codifica para a proteína M (BEALL *et al.*, 1997). Com o sequenciamento da região hipervariável do gene, os tipos aumentaram para 124 (FACKLAM *et al.*, 2002).

Fisiologicamente, de acordo com a classificação de Sherman, os estreptococos podem ser classificados em piogênicos, lactococos (encontrados em leite e derivados), enterococos (encontrados na microbiota intestinal) e viridans (microbiota do trato respiratório humano) (SHERMAN, 1937). Os estreptococos piogênicos pertencem aos grupos A, B, C, F, G, E, e H de Lancefield, produzem beta ou alfa-hemólise, produzem amônia a partir de peptona 4% e crescem a 45 °C. Já o grupo dos estreptococos viridans, que englobam as espécies *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus bovis* e *Streptococcus equinus*, não pertencem a um grupo de

Lancefield, crescem a 45°C e sobrevivem à temperatura de 60°C por 30 minutos. *Streptococcus lactis* e *Streptococcus cremoris* são lactococos, que crescem na temperatura de 10°C e em meio com 0,1% de azul de metileno. Por fim, os enterococos apresentam tolerância a alta e baixa temperatura e sobrevivem tanto em meio alcalino como em meio com cloreto de sódio (SHERMAN, 1937).

O isolamento é feito através de plaqueamento em ágar com sangue de carneiro ou de bovino (TIMONEY, 1999). Após 24 a 48 horas de incubação a 37°C, as colônias geralmente são pequenas, translúcidas e puntiformes, com 1 mm de diâmetro, e possuem hemólise variável. Eles podem ser divididos em beta-hemolíticos (quando causam a hemólise total das hemácias), alfa-hemolíticos (quando causam a hemólise parcial das hemácias) ou gama/não-hemolíticos (TEIXEIRA; PINTO; MELQUIOR, 2015). Reações bioquímicas, que podem ser feitas de forma convencional ou através de kits comerciais (OKWUMABUA; O'CONNOR; SHULL, 2003), também auxiliam na identificação da bactéria. Os principais testes diferenciam o grupo B de Lancefield, que é positivo no teste CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen), na hidrólise de hipurato de sódio e na produção de carotenóide em ágar GBS. O grupo A de Lancefield é positivo para o teste de sensibilidade à bacitracina. Já os testes de sensibilidade à optoquina e de solubilidade em bile diferenciam o *S. pneumoniae* de outros estreptococos alfa-hemolíticos (TIMONEY, 1999).

Os estreptococos também podem ser identificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e por espectrometria de massa de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) (MATAJIRA *et al.*, 2017), entretanto a diferenciação de subespécies apenas é possível através de análise da região 16S do rRNA (MIONI *et al.*, 2018). Essa região também baseia

a análise filogenética e a identificação da similaridade genética dentre as espécies de estreptococos (BENTLEY; LEIGH; COLLINS, 1991). Porém, diferentes espécies como *Streptococcus canis* e *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis* são geneticamente muito parecidas na comparação da região 16S (FACKLAM, 2002), o que dificulta a identificação.

Métodos moleculares mais modernos permitem a identificação e classificação dos estreptococos, como a tipagem da sequência de sete genes *housekeeping* (MLST) ou de repetições em tandem (MLVA), a análise do fingerprint do DNA como nas técnicas de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP), e o sequenciamento do genoma (EFSTRATIOU; LAMAGNI; TURNER, 2017).

2.2 *Streptococcus dysgalactiae*: características gerais e subespécies

A espécie *Streptococcus dysgalactiae* foi descrita pela primeira vez em 1932 por Diernhofer (DIERNHOFER, 1932), porém só foi oficialmente reconhecida em 1983. Na época, estreptococos alfa-hemolíticos do grupo C de Lancefield eram frequentemente isolados de amostras de leite bovino e eram agentes etiológicos reconhecidos de mastite bovina (GARVIE; FARROW; BRAMLEY, 1982). Posteriormente, estudos sobre estreptococos piogênicos baseados em hibridização de DNA mostraram a relação próxima entre *S. dysgalactiae* e *Streptococcus equisimilis* dos grupos de Lancefield G, L e S (FARROW; COLLINS, 1984; KILPPER-BALZ; SCHLEIFER, 1984). Com isso, ambos foram denominados como a mesma espécie, *S. dysgalactiae*.

VANDAMME *et al.* (1996), baseado em características de perfil de parede celular e propriedades bioquímicas, subdividiram *S. dysgalactiae* nas subespécies *dysgalactiae* e *equisimilis*. A designação de subespécie *dysgalactiae* seria utilizada para subpopulações de cepas de origem animal e do grupo L, enquanto a subespécie *equisimilis* seria para cepas de origem humana e do grupo G. A diferenciação entre ambas foi inicialmente proposta pela reação positiva da estreptoquinase no plasminogênio humano. Apesar de VANDAMME *et al.* (1996) proporem que a subespécie *equisimilis* contenha apenas isolados humanos beta-hemolíticos dos grupos de Lancefield C ou G (JENSEN; KILIAN, 2012), isolados beta-hemolíticos de origem animal são hoje denominados *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* (KASUYA *et al.*, 2014; PREZIUSO *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2018; OH *et al.*, 2020), o que gera confusão da nomenclatura correta das subespécies.

A subespécie *dysgalactiae* pertence ao grupo C ou L de Lancefield e inclui cepas de origem animal que são beta, alfa e gama hemolíticas (KASUYA *et al.*, 2014). É a principal subespécie causadora de mastite ambiental clínica e subclínica em vacas (TIMONEY, 2010), com prevalência de 5 a 10% em países europeus e asiáticos (BOTREL *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2017; KOIVULA *et al.*, 2007; RATO *et al.*, 2013). Ela também causa outras infecções importantes em ruminantes, como artrite infecciosa em cordeiros e bezerros (RIDLER *et al.*, 2019; RYAN; ROTHWELL; HORNITSKY, 1991). Além disso, ela causa bacteremia e septicemia com alta mortalidade em peixes e filhotes de cães (ABDELSALAM, CHEN, YOSHIDA, 2009; VELA *et al.*, 2006). Casos raros de infecção em humanos já foram reportados, como celulite após manipulação de peixe cru (KOH *et al.*, 2009), infecção de prótese após artroplastia (PARK *et al.*,

2012), endocardite (JORDAL *et al.*, 2015), artrite (CHENNAPRAGADA *et al.*, 2018) e choque séptico (NATHAN *et al.*, 2021).

Já cepas da subespécie *equisimilis* são beta-hemolíticas e pertencem aos grupos A, C, G, ou L. Essa subespécie causa doenças importantes em diversas espécies, inclusive em humanos, como pneumonia, sepse, endocardite, meningite e síndrome do choque tóxico (BRANDT; SPELLERBERG, 2009; HASHIKAWA *et al.*, 2004). Ela é considerada um patógeno humano emergente por ser um importante agente oportunista relacionado com diversas infecções e inclusive causador de surtos hospitalares (TORRES *et al.*, 2007). Além disso, há potencial zoonótico já sugerido em trabalho de SILVA *et al.* (2015) através da análise de genótipos por MLST de amostras equinas e humanas. O crescente número de infecções invasivas em humanos pela subespécie *equisimilis* e a sintomatologia confundem com *Streptococcus pyogenes*, o que subestima as infecções por *S. dysgalactiae* (SILVA *et al.*, 2015).

Em suínos, a subespécie *equisimilis* é encontrada na cavidade nasal, tonsilas, secreções vaginais e prepuciais como parte da microbiota (GOTTSCHALK; SEGURA, 2019), mas entra na circulação através de feridas na pele e nas patas causada pelo piso áspero da maternidade (ZORIC *et al.*, 2004). Geralmente as fontes de infecção são a secreção vaginal e o leite (WOODS; ROSS, 1977) que contaminam o piso. Após bacteremia e septicemia, o leitão apresenta artrite, endocardite ou meningite (GOTTSCHALK; SEGURA, 2019). Leitões de uma a três semanas de vida apresentam edema na articulação e claudicação como sinais clínicos característicos, além de febre, inapetência e cansaço (GOTTSCHLAK; SEGURA, 2019).

Em equinos, apesar de historicamente ser uma bactéria pouco isolada e considerada oportunista, ela já foi encontrada em casos de placentite, e com menor frequência em abscessos nos linfonodos e doenças similares à adenite equina (TIMONEY, 2004). Todavia, EROL *et al.* (2012) isolou *S. equisimilis* em 21% das amostras avaliadas, principalmente do trato reprodutivo (tecido fetal, placenta, cordão umbilical e trato gênito-urinário). Além disso, a bactéria mostrou habilidade para invadir tecidos como cérebro, rins e articulações, o que mostra virulência similar ao *Streptococcus zooepidemicus* e demonstra uma maior importância dessa bactéria em infecções em equinos do que se presumia.

Em outras espécies, há poucos estudos ou relatos na literatura. Em bovinos, houve um surto de mastite subclínica na Áustria em que se isolou estreptococos beta-hemolíticos do grupo L, depois identificados como *S. equisimilis* (BAUMGARTNER *et al.*, 2011). Em cães, um estudo retrospectivo encontrou *S. equisimilis* em 13% das infecções associadas principalmente com casos de septicemia, dermatite e pneumonia (LAMM *et al.*, 2010). Há também um relato de caso de artrite séptica em um cão com lesão nos testículos e isolamento de *S. equisimilis* no líquido sinovial (DOKUZEYLUL *et al.*, 2014).

Morfoquimicamente, *S. dysgalactiae* tem produção de oxidase e é negativo no teste da esculina, que o diferencia de *Streptococcus uberis* (ZHANG *et al.*, 2017). Outras características bioquímicas que podem diferenciar a espécie incluem a capacidade de hidrolização de hipurato de sódio pela enzima hipuricase e produção de ácido a partir da glicose, da lactose, arabinose e fucose (YANG; LI, 2009), assim como de maltose, sucrose, tagatose e trealose (ABDELSALAM, ASHEG; EISSA, 2013). *S. dysgalactiae* é negativo nos testes PYR (hidrólise de L-pirolidonil-P-naftilamida), CAMP (Christie, Atkins e Munch-

Petersen) e VP (Voges-Proskauer, produção de acetoína). Esses testes identificam respectivamente o *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae* e *S. anginosus* (HASLAM; ST. GEME III, 2018). Em relação às subespécies, as cepas provenientes de animais de *S. equisimilis* se diferenciam das cepas de origem humana pela fermentação de glicogênio e produção de L-propil-L-arginina-aminopeptidase. A subespécie *dysgalactiae* também produz L-propil-L-arginina-aminopeptidase, porém não forma alfa-L-glutamato-aminopeptidase como a subespécie *equisimilis* (EFSTRAIOU *et al.*, 1994).

A subespécie *dysgalactiae* tem como fatores de virulência conhecidos a hialuronidase, a estreptoquinase, as proteínas que se ligam às fibronectinas fnbA e B, proteína G, receptor de plasminogênio, estreptodornase, proteína tipo-M e o receptor de macroglobulina alfa-2. A subespécie *equisimilis* possui também as estreptolisinas S e O (TIMONEY, 2010). A estreptolisina O é uma citolisina dependente de colesterol e sensível ao oxigênio que forma poros na membrana celular dos lisossomos, evitando a sua destruição, e dos eritrócitos (DUNCAN; SCHLEGEL, 1975; HAKANSSON *et al.*, 2005). Já a estreptolisina S é uma citolisina que sofre modificação pós-traducional e causa danos em tecidos moles, eliminação de neutrófilos e diminuição da quimiotaxia da célula do hospedeiro (MOLLOY *et al.*, 2011).

Portanto, a espécie *S. dysgalactiae* inclui uma variedade de linhagens que são bioquimicamente e geneticamente parecidas, entretanto diferem em agrupamento sorológico, tipo de hemólise, hospedeiro acometido e patogenicidade (BERT *et al.*, 1997). DEVRIESE (1991) subdividiu em cinco ecovares de acordo com o hospedeiro: cepas bovinas alfa-hemolíticas, cepas humanas de *S. equisimilis*, cepas animais de *S. equisimilis*, as cepas humanas

do grupo G e cepas do grupo L. VIEIRA *et al.* (1998) propuseram uma classificação de acordo com as semelhanças fenotípicas e genotípicas e é o método mais usado até hoje (KAWATA *et al.*, 2003). Essa classificação divide em quatro tipos: subespécie *dysgalactiae* grupo C alfa-hemolítico, subespécie *equisimilis* grupo C beta-hemolítico, *equisimilis* grupo G beta-hemolítico e *equisimilis* grupo L beta-hemolítico.

2.3 Diversidade genética de *S. dysgalactiae*

As técnicas de epidemiologia molecular são importantes para a definição, identificação e rastreamento de patógenos relevantes e suas espécies, subespécies, cepas, clones e genes, assim como a avaliação do impacto e da evolução da diversidade genética dos mesmos (TIBAYRENC, 2009). A diversidade entre as espécies está geralmente associada aos elementos genéticos móveis, que carregam genes responsáveis pela sua manutenção e regulação, assim como genes que codificam resistência a antimicrobianos e fatores de virulência, através da transferência horizontal de genes (MCNEILLY; MCMILLAN, 2014).

A principal técnica de genotipagem do *S. dysgalactiae* é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), por possuir alto índice discriminatório e aplicabilidade (COSTA *et al.*, 2013). Ele é considerado o padrão ouro no estudo epidemiológico de bactérias patogênicas (PETERS, 2009), e o mais eficaz para o estudo de estreptococos piogênicos (BERT; BRANGER; LAMBERT-ZECHOVSKY, 1997). Para *S. dysgalactiae*, utiliza-se as enzimas de macrorestrição *SmaI* ou *Apal* (ABDELSALAM; ASHEG. EISSA, 2013). NOMOTO

et al. (2006) genotiparam isolados de *S. dysgalactiae* de peixes e de outros mamíferos, e os isolados de mamíferos apresentavam maior variabilidade entre si do que os isolados de peixes. LUNDBERG *et al.* (2014) analisaram isolados de *S. dysgalactiae* de amostras de leite de vacas com mastite e encontrou pulsotipos idênticos em diversos rebanhos, devido ao trânsito de animais e possível transmissão da bactéria pelo vetor *Hydrotea irritans*.

A análise do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP) é uma técnica aplicada para genotipagem de bactérias, em que se pode utilizar de uma a quatro enzimas de restrição (FRY; SAVELKOUL; VISCA, 2009). Essa técnica é economicamente mais viável, rápida e consegue distinguir bem os isolados de *S. dysgalactiae* (MORENO *et al.*, 2016a). No mais, ela aumenta a detecção de polimorfismos e é um bom método para identificar e tipificar cepas (FRY; SAVELKOUL; VISCA, 2009). MORENO *et al.* (2016a) caracterizaram dezessete isolados suínos de *S. dysgalactiae* e obtiveram três perfis (A1, A2 e A3). O perfil A1 correspondeu às doze amostras de *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* (SDSE) com mais de 95% de similaridade, A2 às duas amostras de SDSE de urina com 85% de similaridade e A3 às três amostras de *S. dysgalactiae* subespécie *dysgalactiae* (SDSD) com menos de 80% de similaridade. Já MIONI *et al.* (2018) caracterizaram doze isolados da subespécie *dysgalactiae* de morcegos e encontraram também três perfis: A1, A2 e A3. O agrupamento A1 seria de animais de cidades diferentes e que morreram em dias diferentes, logo uma provável evidência de transmissão horizontal do patógeno.

O sequenciamento parcial do gene que codifica para a superóxido dismutase dependente de manganês (*sodA*) é uma técnica utilizada para distinção de isolados de *S. dysgalactiae* tanto em mamíferos como em peixes

(ABDELSALAM; CHEN; YOSHIDA, 2010; NOMOTO; KAGAWA; YOSHIDA, 2008). Apesar de ser uma ferramenta eficiente e acurada, ela é cara para uso diagnóstico de rotina (ABDELSALAM; SHED; EISSA, 2013). Ademais, devido ao baixo polimorfismo e não distinção clara de isolados, a técnica não é adequada para a genotipagem deste patógeno em peixes (COSTA *et al.*, 2013). GLAZUNOVA; RAOULT E ROUX (2009) investigaram cinco genes diferentes, inclusive *sodA*, para identificação e inferência da filogenia de diversas espécies de estreptococos. O gene *groEL*, que codifica para proteínas que auxiliam no processamento, dobramento e secreção de outras proteínas, mostrou-se uma ferramenta poderosa para diferenciação de espécies de estreptococos. Para *S. dysgalactiae*, a sequência do gene *sodA* teve 88% de similaridade e não houve formação de cluster entre as duas subespécies testadas, enquanto a sequência do gene *groEL* teve 93,9% de similaridade.

A caracterização molecular por tipagem de sequências multilocus (Multilocus sequence typing - MLST) é baseada no sequenciamento de sete genes *housekeeping* (*gki*, *gtr*, *murl*, *mutS*, *recP*, *xpt* e *atoB*) e é considerada uma técnica de alto poder discriminatório e que mostra as características evolutivas do patógeno (COSTA *et al.*, 2013). OH *et al.* (2018) identificaram por esta técnica como causa de peritonite em humanos um isolado de uma variante já identificada na Europa em suínos, o que sugere potencial zoonótico.

O alto desempenho de novas plataformas de sequenciamento de genoma, o uso de bancos de dados como referência e o uso de softwares e pipelines para análise dos dados revolucionaram a pesquisa genômica e suas aplicações (TETTELIN; FELDBLYUM, 2009). A comparação do sequenciamento de genomas de diferentes espécies, subespécies, e estirpes, patogênicas ou não,

dá importantes pistas sobre os principais elementos genéticos responsáveis pelo desenvolvimento e evolução das doenças infecciosas (GUZMAN; ROMEU; GARCIA-VALLVE, 2008). Porém, o sequenciamento ainda é custoso em nosso meio, e pouco acessível para muitos pesquisadores e pacientes, necessitando de um especialista em bioinformática para análise dos dados (PETERSEN *et al.*, 2019).

Em relação ao *Streptococcus dysgalactiae*, NISHIKI *et al.* (2019) sequenciaram um isolado de peixe olho-de-boi e analisaram os genes codificadores de fatores de virulência, sendo alguns comuns à cepa humana, o que implica em risco zoonótico. VELEZ *et al.* (2017) sequenciaram 25 isolados de vacas com mastite e analisaram os genes de resistência antimicrobiana, encontrando maior resistência aos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos (beta-lactamases) e fluoroquinolonas. PORCELLATO *et al.* (2021) sequenciaram 60 genomas de *S. dysgalactiae* subespécie *dysgalactiae* isolados de vacas e ovelhas e analisaram a presença de fatores de virulência como adesinas, ligantes de imunoglobulinas e a proteína M; os perfis por MLST, todos associados à mastite bovina; e a análise filogenética, com a formação de um agrupamento entre os isolados e separação por espécie hospedeira.

A análise do perfil genotípico pode ser feita em combinação com a busca por fatores de virulência, como a tipagem da proteína M, e análise da resistência a antimicrobianos (SOUZA JR. *et al.*, 2016). GHERARDI *et al.* (2014) analisaram isolados humanos de *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* através da tipagem da proteína M e PFGE, em que houve uma correlação entre os grupos de PFGE e os tipos/subtipos de proteína M, e um terço dos isolados tinha resistência à eritromicina e 73% desses à clindamicina. ROJO-BEZARES *et al.* (2021)

analisaram isolados humanos de *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* também por PFGE e encontraram alta diversidade clonal e uma menor resistência à eritromicina e clindamicina do que os estudos anteriores. Já WAJIMA *et al.* (2016) analisaram isolados humanos de infecções invasivas da subespécie *equisimilis* e encontraram um complexo clonal e uma proteína M mais prevalentes no Japão, maior resistência aos macrolídeos do que nos estudos anteriores e sensibilidade aos beta-lactâmicos.

Por fim, o gênero *Streptococcus* e especificamente a espécie *Streptococcus dysgalactiae* tem sofrido muitas alterações taxonômicas e de nomenclatura. Há uma confusão na literatura sobre a nomenclatura correta e distinção entre as subespécies que demanda alguns esclarecimentos (MORICONI *et al.*, 2017). Classicamente, a subespécie *equisimilis* é uma bactéria beta-hemolítica piogênica dos grupos C e G de Lancefield que causa infecção invasiva principalmente em humanos e em animais, e a subespécie *dysgalactiae* é uma bactéria alfa-hemolítica que infecta apenas animais. Entretanto, existem diversas exceções que demonstram a importância dos estudos filogenéticos para entender a relação genética entre as subespécies e das espécies dentro do gênero *Streptococcus*.

A ferramenta mais comum para avaliação da filogenia é a comparação da sequência da região 16s do rRNA (SENTAUSA; FOURNIER, 2013), já que é independente da cultura bacteriana e consegue determinar a diversidade e prevalência do organismo (KLITGAARD *et. al.*, 2008). Existem outras ferramentas utilizadas para análise filogenética, como alguns genes *housekeeping* na análise de sequência de múltiplos locus (MLSA) (SENTAUSA, FOURNIER; 2013), e a sequência do gene 23S rRNA. KAWATA *et. al* (2003)

analisaram 11 isolados de *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* pelas sequências das regiões 16S e 23S do rRNA e obtiveram árvores incongruentes. Isso porque apesar da região 23S ser a mais informativa, ela serve mais de suporte do que para avaliação dos dados gerados pela análise da região 16S (LUDWIG *et al.*, 1998).

2.4 Resistência antimicrobiana de isolados de *S. dysgalactiae*

O uso de antimicrobianos em animais de produção tem sido amplamente discutido por pesquisadores, veterinários, produtores, agências governamentais e membros da indústria agropecuária e alimentícia (RHOUMA *et al.*, 2022). Entretanto, o desenvolvimento de resistência antimicrobiana devido ao uso excessivo, contínuo e/ou mal uso de antimicrobianos é preocupante, e a redução é necessária para uma efetiva diminuição da resistência presente no ambiente, em animais e em humanos (WU, 2018).

O Brasil é um dos maiores produtores de proteína animal do mundo e projeta-se que em 2030, ele responderá por 8% do consumo global de antimicrobianos, sendo, portanto, o terceiro consumidor mundial, atrás da China (30%) e dos Estados Unidos (10%) (VAN BOECKEL *et. al*, 2015). Antibióticos como a tilosina, lincomicina, tiamulina, colistina e eritromicina, assim como as classes dos beta-lactâmicos, tetraciclinas, fluoroquinolonas e sulfonamidas, tiveram seu uso como promotor de crescimento proibido por legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Em 2018, elaborou-se o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos, com participação conjunta de representantes da saúde humana, animal e ambiental

no contexto de Saúde Única. O Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência Antimicrobiana no Âmbito da Agropecuária, implementado em 2021 e que faz parte do Plano de Ação Nacional, incluiu fases de monitoramento ativo e passivo para coleta de dados e posterior discussão de políticas públicas. Porém, nada foi divulgado sobre esses resultados.

O uso de antimicrobianos na suinocultura aumentou nos últimos 20 anos devido à maior disponibilidade, medo de surtos de doenças, maior competitividade do mercado, falta de aconselhamento técnico e falta de controle regulatório (DUTRA *et al.*, 2021). O uso massivo de macrolídeos e lincosamidas para tratamento de infecções levou a emergência de resistência em *Streptococcus suis*, conhecido patógeno suíno e de importância zoonótica, assim como em *S. dysgalactiae* (HAENNI; LUPO; MADEC, 2018). Concomitantemente, o uso excessivo de antibióticos no gado de leite aumenta o risco de microrganismos resistentes e as mastites são o principal problema dessa produção (KABELITZ *et. al*, 2021).

Em humanos, diversos trabalhos mostram a resistência da subespécie *equisimilis* à eritromicina, clindamicina e tetraciclina (LEITNER *et al.*, 2015; LO *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2016). Esta subespécie permanece sensível à penicilina e outros beta-lactâmicos, e tem susceptibilidade variável às tetraciclinas, macrolídeos, clindamicinas e fluoroquinolonas (ROJO-BEZARES *et al.*, 2021). Os beta-lactâmicos, portanto, continuam a ser a melhor escolha de tratamento para suínos, bovinos e humanos (LU *et al.*, 2016; KABELITZ *et. al*, 2021). Entretanto, os estudos analisados mostram o aumento crescente da resistência a diferentes classes de antimicrobianos e a necessidade de mais estudos, dado que *S. dysgalactiae* possui potencial zoonótico.

3. OBJETIVOS

Caracterizar estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* isoladas de suínos e bovinos utilizando métodos fenotípicos, como a determinação do perfil de resistência por microdiluição em caldo, e genotípicos, como polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolados bacterianos

Foram selecionados noventa e dois (92) isolados identificados como *Streptococcus dysgalactiae* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Resistência a Antimicrobianos (FMVZ – USP). Os isolados são provenientes de amostras de bovinos com quadro de pododermatite, metrite ou mastite e de amostras de suínos com quadro de metrite, pneumonia, artrite ou abscesso. Os isolamentos ocorreram entre os anos de 2015 e 2019 e os rebanhos de origem são provenientes dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso.

Os isolados foram descongelados, semeados em ágar sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubados em anaerobiose a 37° C por 24 a 48 horas. Observou-se a morfologia das colônias e o tipo de hemólise produzida. Em seguida, as estirpes foram semeadas em caldo Brain Heart

Infusion (BHI, Difco) a 37°C por 24h e uma alíquota da cultura foi utilizada para extração de DNA.

4.2 Identificação pelo MALDI TOF MS

A preparação das amostras seguiu o protocolo de HIJAZIN *et al.* (2012). Em um microtubo com 300 µl de água ultrapura (Milli-Q®) adicionou-se uma alçada da colônia semeada em ágar sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, e agitou-se no vórtex por alguns segundos. Depois, adicionou-se 900 µl de etanol absoluto e centrifugou-se a 13.300 rotações por minuto (RPM) por 3 minutos e meio. Após descarte do sobrenadante, deixou-se os microtubos à temperatura ambiente para secagem do pellet. Adicionou-se 30 µl de ácido fórmico 70% e incubou-se em temperatura ambiente por 3 minutos. Após agitação no vórtex, adicionou-se 30 µl de acetonitrila e incubou-se em temperatura ambiente por 1 minuto. Após uma nova agitação, a mistura foi novamente centrifugada a 13.300 RPM por 3 minutos e 30 µl do sobrenadante foi transferido a um microtubo novo e armazenado a – 20 °C.

Para identificação pelo MALDI-TOF MS foi utilizado o espectrômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik) da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB. Para leitura, 1 µL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox de 96 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1 µL da matrix (ácido α-ciano-4-hidróxido-cinamico). Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX. Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA

Systems) 3.0 (Bruker Daltonik) a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados para cada isolado com a biblioteca do fabricante. Desta comparação de presença/ausência de picos específicos por gênero e espécie bacteriana, obteve-se um valor de escore (log (score) value). O critério para interpretação do padrão da fabricante Bruker Daltonik foi utilizado neste estudo como segue: escores ≥ 2.0 foram aceitos para atribuição de espécie; e escores ≥ 1.7 e < 2.0 foram utilizados apenas para identificação de gênero.

4.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com o kit DNeasy Blood and Tissue® (Qiagen) de acordo com protocolo determinado pelo fabricante. Foi feito um tratamento enzimático prévio do pellet com lisozima (20 mg/mL) incubada a 37° C por 40 minutos. As amostras de DNA foram armazenadas a – 20° C até o momento das análises.

4.4 Reação em cadeia da polimerase

A partir do DNA extraído foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação da espécie *Streptococcus dysgalactiae* de acordo com o protocolo de RIFFON *et al.* (2001).

Tabela 1 – Iniciadores utilizados para identificação da espécie *Streptococcus dysgalactiae*.

Primers	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
Sdy 519 Forward	GGCTCAACCACTNTACGCTT	401
Sdy 920 Reverse	ATCTCTAGACCGGTCAGGAG	

Fonte: RIFFON et. al (2001)

A PCR foi realizada com o seguinte programa: um ciclo a 95° C por 15 minutos, 30 ciclos de 95° C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 45 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. A detecção do produto amplificado foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando-se tampão TBE 0,5X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM, ph 8), corante Blue Green® (LGC Biotecnologia), e voltagem de 110 V durante 1 hora. Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* (Bio-Rad) e comparados ao marcador *100 pb DNA Ladder®* (New England Bio Labs Inc.).

4.5 Genotipagem por Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos

Amplificados (AFLP)

A técnica de AFLP foi realizada com uma única enzima de restrição - HindIII (New England Biolabs), seguindo o protocolo de MCLAUCHLIN *et al.* (2000). Os fragmentos de DNA foram corados com BlueGreen® (LGC Biotecnologia) e detectados por meio de eletroforese a 90V durante 4 horas em gel de agarose 2%. As imagens foram capturadas sob iluminação UV pelo sistema *Gel Doc XR*

(Bio-Rad). Os fragmentos amplificados foram identificados com base no marcador de peso molecular *100 pb DNA Ladder*® (New England Bio Labs Inc.).

4.6 Caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos

Para a determinação dos perfis de resistência a antimicrobianos foi realizada a microdiluição em caldo conforme os padrões definidos no documento do CLSI VET01S (2020) para determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM). Para tanto foi montado um painel em microplaca composto pelos seguintes antimicrobianos: ceftiofur, ampicilina, penicilina, doxiciclina, oxitetraciclina, florfenicol, marbofloxacina, enrofloxacina, gentamicina, neomicina, espectinomicina, clindamicina, tilosina, tilmicosina, tulatromicina, tiamulina, sulfadimetoxina, trimetoprima/sulfametoxazol. A Figura 1 ilustra a disposição e as concentrações dos respectivos antimicrobianos testados na microplaca.

A turbidez do cultivo foi ajustada com solução salina estéril (0,9%) de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland e confirmada em espectrofotômetro (~0,150 em OD 600 nm). Esta suspensão bacteriana ajustada possui aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL. Uma vez ajustada, a suspensão bacteriana foi diluída na ordem de 1:1000 em caldo Mueller Hinton II (Difco), suplementado com 5% de soro fetal bovino, de maneira a obter uma concentração final de, aproximadamente, 5 x 10⁵ UFC/mL. A partir desta suspensão, 50 µL foram então distribuídos em cada poço da microplaca. Após a distribuição do inóculo na placa, esta foi selada com adesivo e incubada a 37°C por 24 horas.

As concentrações inibitórias mínimas foram aferidas visualmente como as menores contrações dos antimicrobianos nos poços sem crescimento bacteriano (sem a formação de botão). Foi utilizada como controle de qualidade a estirpe de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, conforme preconizado pelo documento VET01S (2020). Para a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos, foram utilizados os pontos de corte descritos nos documentos VET01S (2020) e M100 Ed32 (CLSI, 2022) e apresentados na tabela 2. A determinação da multirresistência foi realizada conforme descrito for SCHWARTZ et al. (2010).

Figura 1 – Esquema de distribuição dos antimicrobianos no painel utilizado para a realização da microdiluição em caldo. Concentração de antimicrobianos em µg/mL.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TIO 8	TIA 32	DOX 8	OXI 8	MAR 4	AMP 16	PEN 1	SPE 128	TYL 4	TUL 4	SXT 2/38	SUL 256
B	TIO 4	TIA 16	DOX 4	OXI 4	MAR 2	AMP 8	PEN 0,5	SPE 64	TYL 2	TUL 2	CLIN 8	ENO 4
C	TIO 2	TIA 8	DOX 2	OXI 2	MAR 1	AMP 4	PEN 0,25	SPE 32	TYL 1	TUL 1	CLIN 4	ENO 2
D	TIO 1	TIA 4	DOX 1	OXI 1	MAR 0,5	AMP 2	PEN 0,12	SPE 16	TYL 0,5	TIL 64	CLIN 2	ENO 1
E	TIO 0,5	TIA 2	DOX 0,5	OXI 0,5	MAR 0,25	AMP 1	NEO 32	SPE 8	TUL 64	TIL 32	CLIN 1	ENO 0,5
F	TIO 0,25	TIA 1	TIA 0,5	GEN 1	MAR 0,12	AMP 0,5	NEO 16	TYL 32	TUL 32	TIL 16	CLIN 0,5	ENO 0,25
G	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	MAR 0,06	AMP 0,25	NEO 8	TYL 16	TUL 16	TIL 8	CLIN 0,25	ENO 0,12
H	FLOR 8	FLOR 4	FLOR 2	FLOR 1	FLOR 0,5	FLOR 0,25	NEO 4	TYL 8	TUL 8	TIL 4	POS	POS

Legenda: AMP – Ampicilina, CLIN – Clindamicina, DOX – Doxiciclina, ENO – Enrofloxacin, GEN – Gentamicina, MAR – Marbofloxacin, NEO – Neomicina, OXI – Oxitetraciclina, PEN – Penicilina, SPE – Espectinomicina, SUL – Sulfadimetoxina, SXT – Trimetoprima/sulfametoxazol, TIA – Tiamulina, TIL – Tilmicosina, TIO – Ceftiofur, TUL – Tulatromicina, TYL – Tilosina, POS – controle positivo (apenas crescimento bacteriano).

Fonte: MATAJIRA, C. E. C. (2019).

Tabela 2 – Concentrações de antimicrobianos testados, amplitude e pontos de corte empregados para classificação dos resultados obtidos.

Antimicrobiano	Amplitude (µg/mL)	Pontos de corte		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Ceftiofur	0,25 – 8	≤2	4	≥8
Ampicilina	0,25 - 16	≤0,25	0,5	≥1,0
Penicilina	0,12 – 1	≤0,12	-	≥0,25
Doxiciclina	0,5 - 8	≤0,5	1	≥2
Oxitetraciclina	0,5 - 8	≤0,5	1	≥2
Marbofloxacina	0,06 - 4	≤1	2	≥4
Enrofloxacina	0,12 - 4	≤0,5	1 e 2	≥4
Florfenicol	0,25 - 8	≤2	4	≥8
Espectinomicina	8 - 128	≤32	64	≥128
Gentamicina	1 - 16	≤2	4	≥8
Neomicina	4 - 32	≤8	-	-
Clindamicina	0,25 - 8	≤0,25	0,5	≥1
Tilosina	0,5 - 32	≤1	2	≥4
Tilmicosina	4 - 64	≤8	16	≥32
Tulatromicina	1 - 64	≤16	32	≥64
Tiamulina	0,5 - 32	≤16	-	≥32
Sulfadimetoxina	256	≤256	-	≥512
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	2/38	≤2/38	-	≥4/76

4.7 Análise estatística

Para a análise de agrupamento dos perfis de fragmentos amplificados (AFLP) e do perfil de resistência antimicrobiana foi utilizado o programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths). Os perfis de resistência foram transformados em dados binários e para a análise de agrupamento dos perfis foi construído um dendrograma utilizando o coeficiente de “*different values*” e o método de Ward. O dendrograma do AFLP foi construído utilizando o coeficiente de Dice e o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O ponto de corte de 90% de similaridade genética foi utilizado para determinação dos agrupamentos (genótipos) obtidos (VAN BELKUM *et al.*, 2007).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos Isolados Bacterianos

As 92 estirpes reativadas tiveram sua identificação confirmada como *Streptococcus dysgalactiae* por MALDI-TOF MS e por PCR. A distribuição dos isolados de acordo com a espécie animal, Estado de origem e ano de isolamento é descrita nas tabelas 3, 4 e 5. O tipo de hemólise observado no plaqueamento em ágar sangue de carneiro desfibrinado é descrito na tabela 6 e ilustrada pela figura 2. No período avaliado, foi selecionada uma maior concentração de amostras vindas dos estados de São Paulo (47,8%) e Mato Grosso (40,2%) e dos anos de 2018 (41,3%) e 2019 (38%). Todos os isolados bovinos apresentaram alfa-hemólise e 89,7% dos isolados suínos apresentaram beta-hemólise.

Tabela 3 – Distribuição das estirpes avaliadas segundo a espécie animal de origem.

Espécie	Nº estirpes	Porcentagem (%)
Suína	49	53,2
Bovina	43	46,8
Total	92	100

Tabela 4 - Distribuição das estirpes avaliadas de acordo com o Estado de origem.

Estado	N° estirpes	Porcentagem (%)
São Paulo	44	47,8
Mato Grosso	37	40,2
Minas Gerais	8	8,7
Paraná	3	3,3
Total	92	100

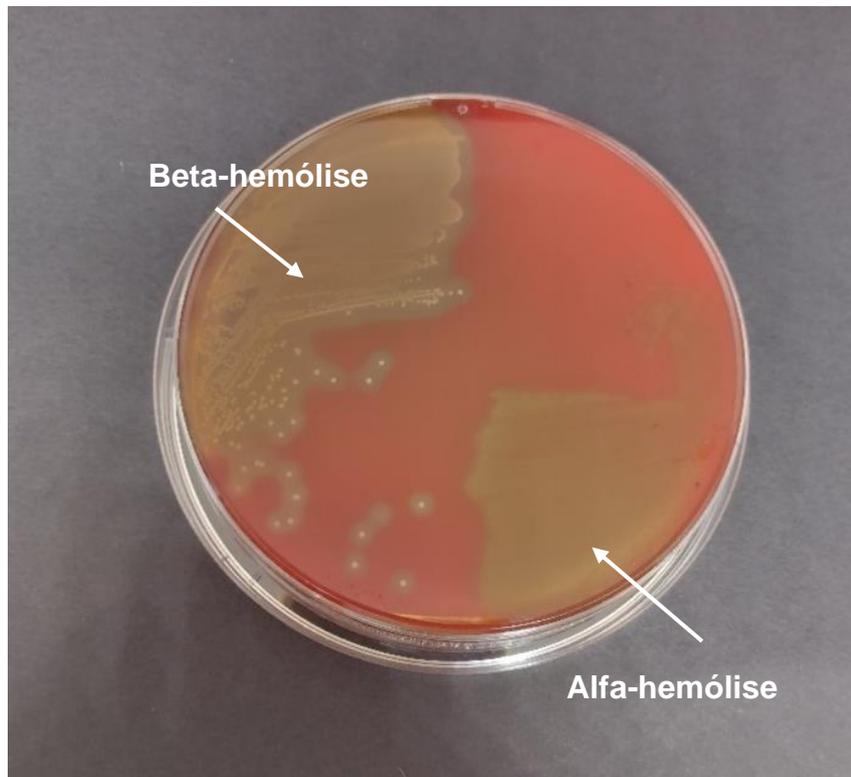
Tabela 5 - Distribuição das estirpes avaliadas segundo o ano de isolamento.

Ano de isolamento	N ° estirpes	Porcentagem (%)
2019	35	38
2018	38	41,3
2017	8	8,7
2015	11	12
Total	92	100

Tabela 6 – Tipo de hemólise observada nas estirpes de acordo com a origem.

Tipo de Hemólise	Estirpe Suína N (%)	Estirpe Bovina N (%)	Total estirpes N (%)
Alfa (Parcial)	4 (4,3)	43 (46,7)	47 (51)
Beta (Total)	44 (47,8)	0	44 (47,8)
Gama (não hemolítico)	1 (1,2)	0	1 (1,2)
Total	49	43	92 (100)

Figura 2 – Placa de ágar sangue com crescimento de estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* beta-hemolítico do lado esquerdo e alfa-hemolítico do lado direito.



Fonte: Norte, A.P.C. (2023).

A Tabela 7 descreve os sítios de isolamento das estirpes avaliadas, sendo estas provenientes de quadros de pneumonia, artrite, metrite, abscesso, pododermatite e mastite. No caso das estirpes de origem bovina, a maioria (60,46%) é proveniente de quadros de mastite, e no caso das estirpes de origem suína, a maioria é de quadros de metrite (87,7%).

Tabela 7 – Frequência das estirpes estudadas de acordo com o sítio de isolamento.

Quadros clínicos	Estirpe suína N (%)	Estirpe bovina N (%)	Total N (%)
Abscesso	2 (4,0)	0	2 (2,17)
Pneumonia	3 (6,12)	0	3 (3,26)
Metrite	43 (87,7)	6 (13,95)	49 (53,26)
Mastite	0	26 (60,46)	26 (28,26)
Pododermatite	0	11 (25,59)	11 (11,95)
Artrite	1 (2,0)	0	1 (1,1)
Total	49 (100)	43 (100)	92 (100)

5.2 Análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)

Na caracterização pelo AFLP foram identificados 18 perfis (A1 a A18). A análise do agrupamento está apresentada na Figura 3. Os maiores agrupamentos encontrados foram o A5 com 18 isolados (19,5% do total) e o A15 com 13 isolados (14,1 % do total). Enquanto o agrupamento A5 refere-se às estirpes de origem suína de casos de metrite do ano de 2018 e em sua maioria do estado do Mato Grosso, o agrupamento A15 refere-se às estirpes de origem bovina provenientes de quadros de mastite do ano de 2019 do estado de São Paulo.

Os perfis foram divididos em dois agrupamentos principais com pouco mais de 75% de similaridade. Nesses agrupamentos houve a separação das estirpes de origem suína e de origem bovina em ramificações distintas. Os perfis A1 ao A10 correspondem às estirpes de origem suína e os perfis A11 ao A17 reúnem estirpes de origem bovina. Duas estirpes de origem bovina provenientes de um animal com quadro de mastite se destacaram destes dois agrupamentos e foram

isoladas em uma ramificação denominada perfil A18, com 65% de similaridade em relação às outras estirpes.

As estirpes de origem bovina foram reunidas de acordo com o rebanho e o animal de origem, como pode ser observado nos perfis A12, A13, A15, A17 e A19. Já as estirpes de origem suína apresentaram maior heterogeneidade, com isolados do mesmo rebanho sendo distribuídos em perfis diferentes. O rebanho 12 possui isolados dos perfis A4, A5, A6, A9 e A10. O rebanho 13 possui isolados dos perfis A1, A3, A5, A6, A7 e A10. Além disso, estirpes do mesmo animal apresentaram perfis genotípicos diferentes, como o animal 42 que possui os perfis A4 e A9, e o animal 43 que possui os perfis A5 e A10.

Figura 3 – Dendrograma ilustrando as relações entre os perfis de restrição de *Streptococcus dysgalactiae* pela técnica do AFLP.

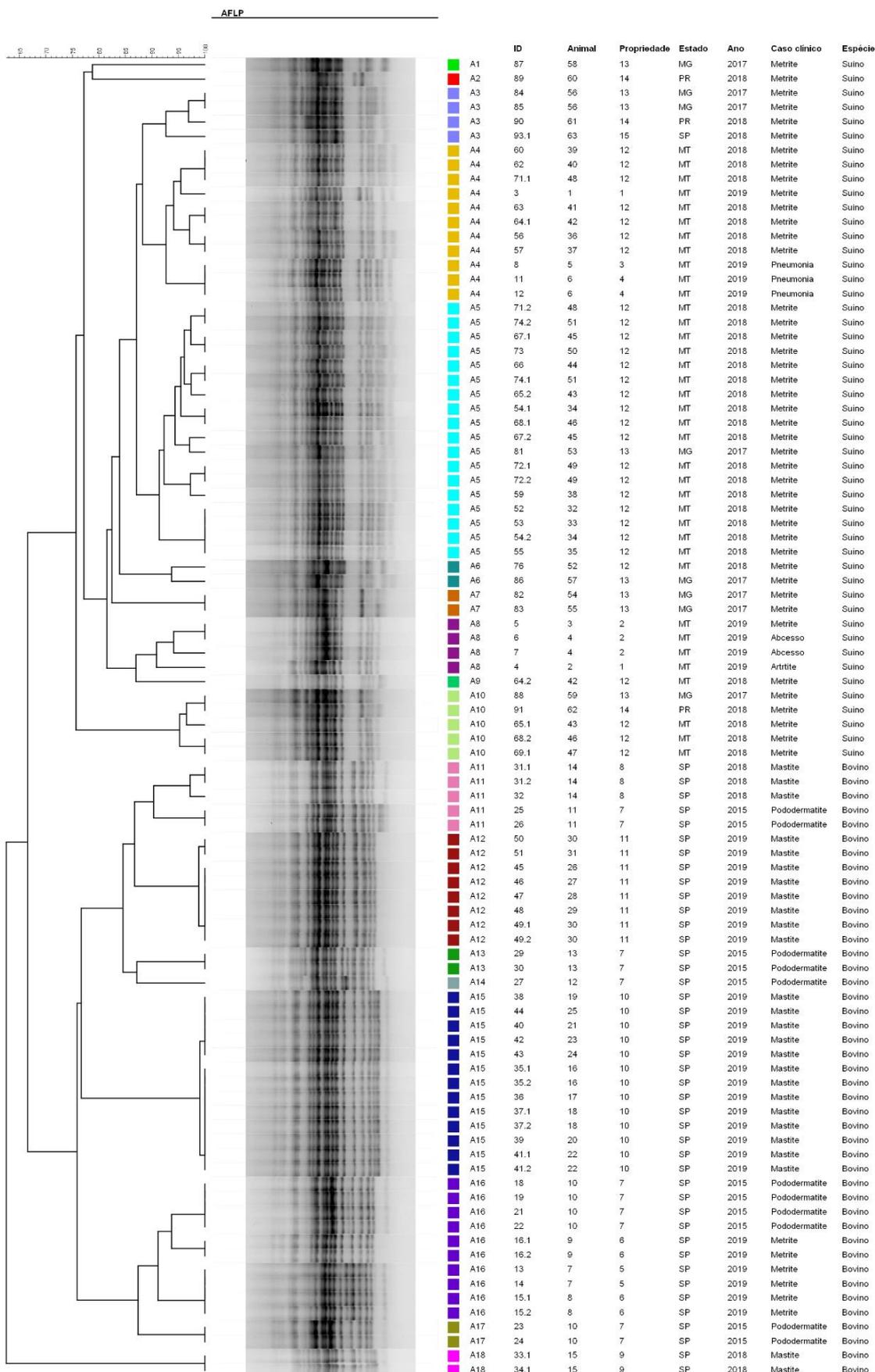
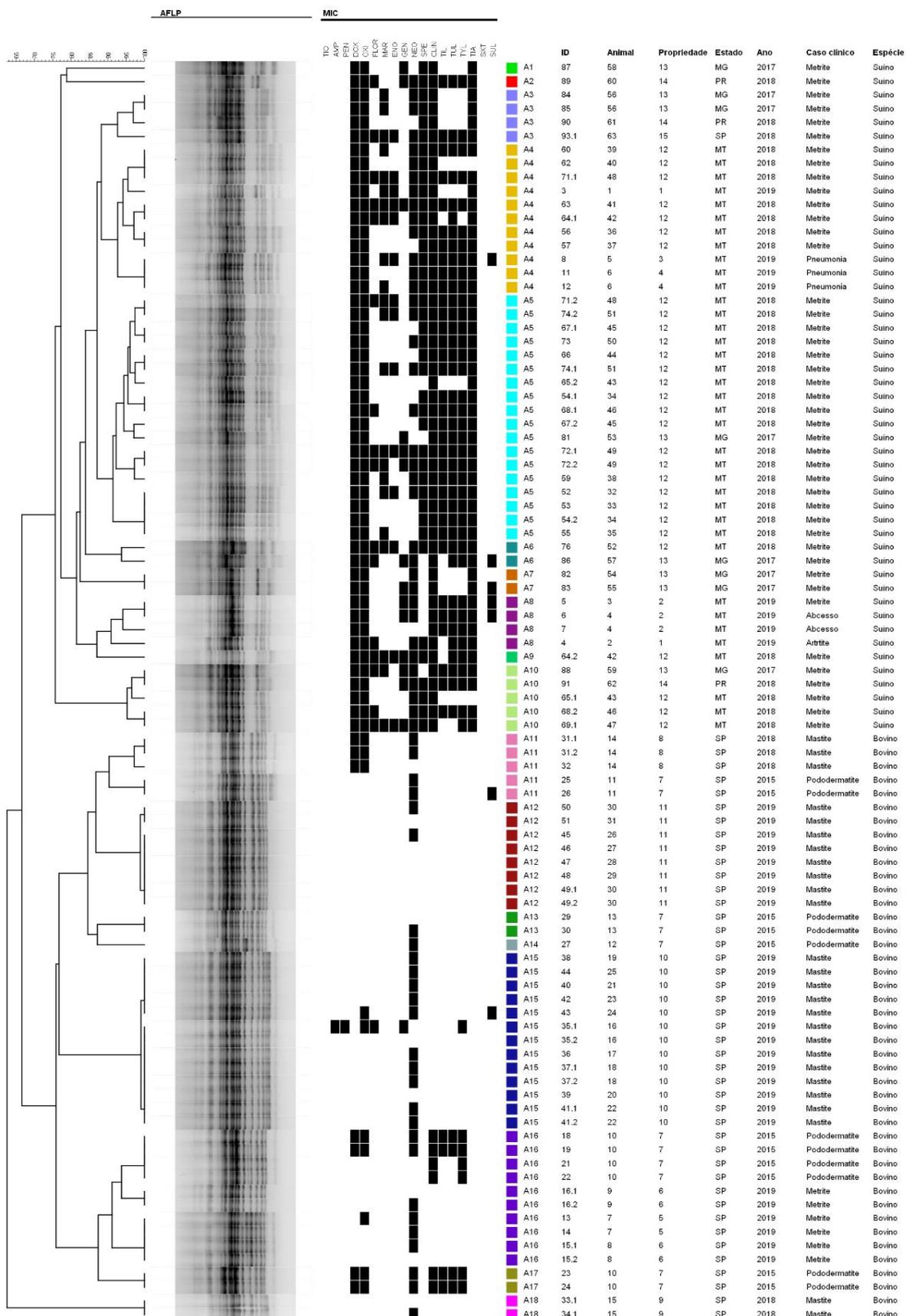


Figura 4 - Dendrograma correlacionando os genótipos de AFLP dos isolados de *Streptococcus dysgalactiae* com a concentração inibitória mínima.



5.3 Caracterização da resistência antimicrobiana

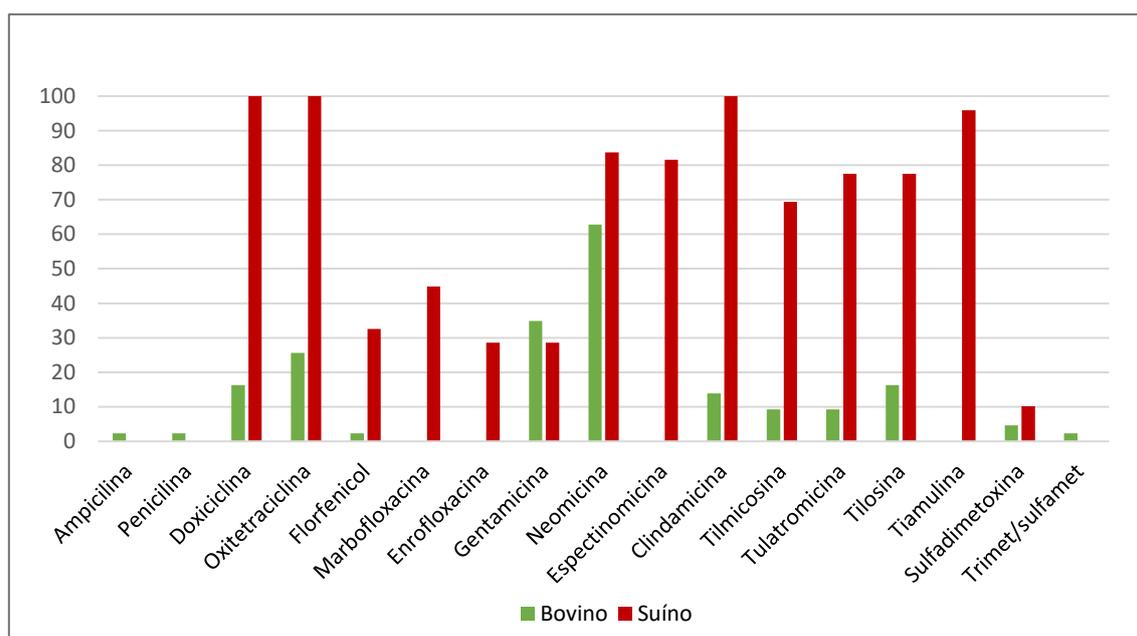
Não houve correlação direta entre os perfis genotípicos obtidos no AFLP e os perfis de resistência observados na determinação da concentração inibitória mínima, como pode ser observado na Figura 4. No entanto é possível observar nessa figura que as estirpes de origem suína apresentam maiores níveis de resistência que as estirpes de origem bovina. As taxas de resistência aos antimicrobianos testados e os valores de CIM 50 e CIM 90 estão descritos nas tabelas 8 e 9. Em relação às estirpes de origem bovina, a maior frequência de resistência observada foi à neomicina (62,8%), seguido da gentamicina (34,9%), e oxitetraciclina (25,6%). Observa-se baixa resistência à doxiciclina, macrolídeos, clindamicina e tilosina. Apenas uma estirpe de mastite teve resistência à ampicilina, penicilina e florfenicol. Em relação às sulfonamidas, uma estirpe de mastite teve resistência tanto à trimetoprima/sulfametoxazol como à sulfadimetoxina. Todas as estirpes foram sensíveis às fluoroquinolonas, ceftiofur, espectinomicina e tiamulina. Doze estirpes foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Todas as estirpes de origem suína foram resistentes à doxiciclina, oxitetraciclina e clindamicina. Além disso, observou-se alta frequência de resistência aos macrolídeos, pleuromutilina, espectinomicina e neomicina. As fluoroquinolonas, florfenicol e gentamicina tiveram frequência de resistência intermediária. Todas as estirpes foram sensíveis aos beta-lactâmicos e à associação trimetoprima/sulfametoxazol.

O Gráfico 1 e as Tabelas 8 e 9 evidenciam a maior ocorrência de resistência nas estirpes suínas comparado às estirpes bovinas. No Gráfico 1 não foram

incluídos os resultados obtidos com o antimicrobiano ceftiofur, da classe dos beta-lactâmicos, pois os índices de resistência observados em todas as estirpes foram iguais a zero.

Gráfico 1 – Taxas de resistência observadas nas estirpes de *S. dysgalactiae* isoladas de suínos e bovinos frente aos antimicrobianos testados.



Fonte: Norte, A.P.C. (2023).

Tabela 8 - Distribuição das estirpes de *S. dysgalactiae* de origem bovina segundo os valores de CIM, valores de CIM 50 e CIM 90, e frequências de resistência identificadas.

Antimicrobianos CIM (µg/ml)	Número de cepas – Bovinos*													CIM 50 (µg/mL)	CIM 90 (µg/mL)	Res %
	≤0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128			
Ceftiofur			42	0	1	0	0	0						≤0,25	≤0,25	0
Ampicilina			42	0	0	0	0	0	1					≤0,25	≤0,25	2,3
Penicilina		42	0	0	1									≤0,12	≤0,12	2,3
Doxiciclina				35	1	0	4	3						≤0,5	4	16,3
Oxitetraciclina				19	13	4	0	1	6					1	>8	25,6
Florfenicol			0	2	18	22	0	0	1					2	2	2,3
Marbofloxacina	1	2	3	17	20	0	0	0						0,5	1	0
Enrofloxacina		3	12	22	6	0	0	0						0,5	1	0
Gentamicina					13	15	14	0	1	0				2	4	34,9
Neomicina							10	6	18	9	0			16	32	62,8
Espectinomicina								29	12	1	1	0	0	≤8	16	0
Clindamicina			37	0	0	0	0	0	6					0,25	>8	13,9
Tilmicosina							39	0	0	1	1	2		4	4	9,3
Tulatromicina					37	1	1	0	0	0	0	4		≤1	4	9,3
Tilosina				36	0	1	0	0	0	0	6			0,5	>32	16,3
Tiamulina				42	1	0	0	0	0	0	0			0,5	0,5	0

* As células a direita das barras laterais indicam os valores a partir dos quais as estirpes são consideradas resistentes.

CIM (µg/ml)	≤256	>256	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
Sulfadimetoxina	41	2	≤256	≤256	4,6
CIM (µg/ml)	≤2/38	>2/38	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
Trimetoprima/sulfametoxazol	42	1	≤2/38	≤2/38	2,3

Tabela 9 - Distribuição das estirpes de *S. dysgalactiae* de origem suína segundo os valores de CIM, valores de CIM 50 e CIM 90, e frequências de resistência identificadas.

Antimicrobianos CIM (µg/ml)	Número de cepas – Suínos*													CIM 50 (µg/mL)	CIM 90 (µg/mL)	Res %
	≤0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128			
Ceftiofur			49	0	0	0	0	0	0					≤0,25	≤0,25	0
Ampicilina			49	0	0	0	0	0	0					≤0,25	≤0,25	0
Penicilina		49	0	0	0	0								≤0,12	≤0,12	0
Doxiciclina				0	0	1	5	31	12					8	>8	100
Oxitetraciclina				0	0	0	0	0	49					>8	>8	100
Florfenicol			0	1	2	29	1	0	16					2	>8	32,6
Marbofloxacina	0	0	0	2	5	20	18	4						2	4	44,9
Enrofloxacina		0	2	5	3	25	10	4						2	4	28,6
Gentamicina					5	11	19	7	3	4				4	16	28,6
Neomicina							8	5	6	13	17			32	64	83,7
Espectinomomicina								1	6	2	0	0	40	>128	>128	81,6
Clindamicina			0	0	1	1	5	2	40					>8	>8	100
Tilmicosina							12	1	2	0	0	34		>64	>64	69,4
Tulatromicina					5	5	0	0	0	1	1	37		>64	>64	77,5
Tilosina				10	0	1	2	1	0	1	34			>32	>32	77,5
Tiamulina				0	0	0	1	0	1	13	34			>32	>32	95,9

* As células a direita das barras laterais indicam os valores a partir dos quais as estirpes são consideradas resistentes.

CIM (µg/ml)	≤256	>256	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
Sulfadimetoxina	44	5	≤256	≤256	10,2
CIM (µg/ml)	≤2/38	>2/38	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
Trimetoprima/sulfametoxazol	49	0	≤2/38	≤2/38	0

Considerando-se o critério de multirresistência como a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos de acordo com SCHWARZ et. al (2010), 59,7% das estirpes foram caracterizadas como multirresistentes, de acordo com as Tabelas 10 e 11. Em relação à espécie de origem do isolamento, 100% das estirpes suínas e 14% das estirpes bovinas são multirresistentes. Das estirpes bovinas multirresistentes, quatro são de pododermatite e duas de mastite. Como observa-se na Figura 5, as estirpes de pododermatite são resistentes às tetraciclina, neomicina, clindamicina e macrolídeos; são do rebanho 7 e possuem os perfis genotípicos A16 e A17. As duas estirpes multirresistentes de mastite são do rebanho 10 e do perfil genotípico A15. Das estirpes suínas multirresistentes, 85,6% são resistentes a cinco ou mais classes de antimicrobianos das nove classes testadas. As treze estirpes suínas com maior nível de resistência são em sua maioria de metrite e do estado do Mato Grosso, exceto duas estirpes de metrite do estado de Minas Gerais, uma estirpe de metrite de São Paulo e uma estirpe de pneumonia do Mato Grosso.

Tabela 10 – Comparação entre as taxas de resistência de *S. dysgalactiae* isoladas de bovinos e suínos frente aos antimicrobianos testados.

Classe	Antimicrobiano	Bovino		Suíno		p valor ¹
		N	(%)	N	(%)	
Beta lactâmico	Ceftiofur	0	0	0	0	1,0*
	Ampicilina	1	2,3	0	0	0,467*
	Penicilina	1	2,3	0	0	0,467*
Tetraciclina	Doxiciclina	7	16,3	49	100	< 0,001
	Oxitetraciclina	11	25,6	49	100	< 0,001
Fluoroquinolonas	Marbofloxacina	0	0	22	44,9	< 0,001
	Enrofloxacina	0	0	14	28,6	< 0,001
Aminoglicosídeos	Gentamicina	15	34,9	14	28,6	0,002
	Neomicina	27	62,8	41	83,7	0,271
	Espectinomicina	0	0	40	81,6	< 0,001
Fenicóis	Florfenicol	1	2,3	16	32,6	< 0,001
Sulfas	Sulfadimetoxina	2	4,6	5	10,2	0,442*
	Trimetoprima/ sulfametoxazol	1	2,3	0	0	0,467*
Lincosamidas	Clindamicina	6	13,9	49	100	< 0,001
Pleuromutilinas	Tiamulina	0	0	47	95,9	< 0,001
Macrolídeos	Tilmicosina	4	9,3	34	69,4	< 0,001
	Tilosina	4	9,3	38	77,5	< 0,001
	Tulatromicina	7	16,3	38	77,5	< 0,001

¹ Probabilidade pelo teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (*).

Tabela 11 - Distribuição das estirpes estudadas segundo origem de isolamento e o número de classes de antimicrobianos as quais se observou resistência.

Resistência	Isolado suíno N (%)	Isolado bovino N (%)	Total N (%)
0 classes	0	12 (28)	12 (13,1)
1 classe	0	19 (44)	19 (20,7)
2 classes	0	6 (14)	6 (6,5)
3 classes	3 (6,3)	1 (2,3)	4 (4,3)
4 classes	4 (8,1)	4 (9,4)	8 (8,7)
5 classes	16 (32,6)	1 (2,3)	17 (18,5)
6 classes	13 (26,5)	0	13 (14,1)
7 classes	13 (26,5)	0	13 (14,1)

A partir dos resultados de concentração inibitória mínima (Figura 5), identificou-se os perfis de resistência antimicrobiana que distinguiu as estirpes bovinas e suínas em, respectivamente, 10 e 29 grupos. Como observado na tabela 12, 27,9% das estirpes bovinas foram sensíveis a todos os antimicrobianos e 41,9% foram resistentes apenas à neomicina. Oito estirpes são multirresistentes e possuem resistência em comum à oxitetraciclina. As quatro estirpes com resistência a sete antimicrobianos são provenientes de pododermatite do mesmo animal e rebanho isolados no ano de 2015. Elas possuem resistência às tetraciclinas e macrolídeos. Já a estirpe com resistência a seis antimicrobianos é proveniente de um quadro de mastite isolado em 2019. É a única estirpe do estudo com resistência à penicilina e ampicilina. As estirpes suínas, contrariamente, apresentam grande variabilidade de perfis de resistência, como observado na tabela 13. Os agrupamentos P9 e P25 são os mais numerosos, com sete e quatro estirpes respectivamente. Ambos possuem resistência às tetraciclinas, clindamicina, tiamulina, espectinomicina e macrolídeos e são provenientes de quadros de metrite isolados em 2018. Curiosamente, das onze estirpes, dez são do estado do Mato Grosso e uma do estado de São Paulo, sendo a última do agrupamento P25.

Figura 5 - Dendrograma ilustrando as relações entre as concentrações inibitórias mínimas das estirpes de *Streptococcus dysgalactiae*.

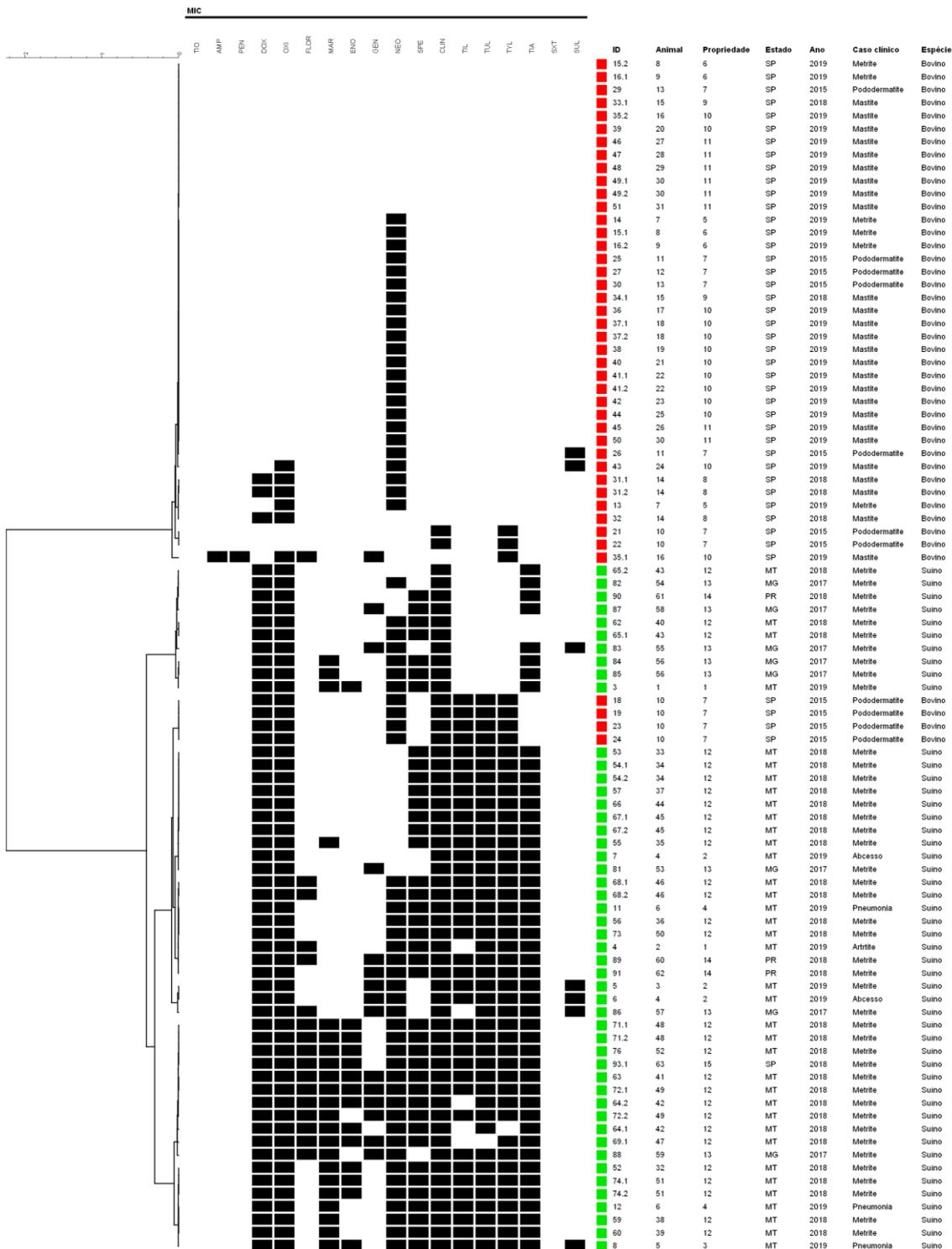


Tabela 12 - Perfis de resistência antimicrobiana das estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* de origem bovina.

Bovino	Perfil	N (%)
P1	-	12 (27,9)
P2	NEO	18 (41,9)
P3	NEO/SUL	1 (2,3)
P4	OXI/ NEO/SXT/SUL	1 (2,3)
P5	DOX/OXI/ NEO	2 (4,7)
P6	OXI/NEO	1 (2,3)
P7	OXI/DOX	1 (2,3)
P8	CLI/TYL	2 (4,7)
P9	AMP/PEN/OXI/FLOR/GEN/TYL	1 (2,3)
P10	OXI/DOX/NEO/CLI/TIL/TUL/TYL	4 (9,3)
		43 (100)

Tabela 13 – Perfis de resistência antimicrobiana das estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* de origem suína.

Suíno	Perfil	N (%)
P1	DOX/OXI/CLI/TIA	1 (2)
P2	DOX/OXI/CLI/SPE/NEO	2 (4,2)
P3	DOX/OXI/CLI/TIA/NEO	1 (2)
P4	DOX/OXI/CLI/TIA/SPE	1 (2)
P5	DOX/OXI/CLI/TIA/GEN/SPE	1 (2)
P6	DOX/OXI/CLI/NEO/SPE/TIA/MAR	2 (4,2)
P7	DOX/OXI/CLI/TIA/TYL/TUL/TIL	1 (2)
P8	DOX/OXI/CLI/TIA/NEO/GEN/SUL	1 (2)
P9	DOX/OXI/CLI/TIA/SPE/TYL/TUL/TIL	7 (14,3)
P10	DOX/OXI/CLI/TIA/NEO/SPE/ENO/MAR	1 (2)
P11	DOX/OXI/CLI/TIA/GEN/TYL/TUL/TIL	1 (2)
P12	DOX/OXI/CLI/TIA/NEO/SPE/TYL/TUL/TIL	3 (6,1)
P13	DOX/OXI/CLI/TIA/MAR/SPE/TYL/TUL/TIL	2 (4,2)
P14	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/NEO/SPE/TYL/TUL	1 (2)
P15	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/NEO/SPE/TYL/TUL/TIL	2 (4,2)
P16	DOX/OXI/CLI/TIA/GEN/NEO/TYL/TUL/TIL/SUL	2 (4,2)
P17	DOX/OXI/CLI/TIA/MAR/NEO/SPE/TYL/TUL/TIL	2 (4,2)
P18	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/NEO/SPE/TYL/TIL/ENO	1 (2)
P19	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/GEN/NEO/TYL/TUL/SUL	1 (2)
P20	DOX/OXI/CLI/TIA/GEN/NEO/SPE/TYL/TUL/TIL	1 (2)
P21	DOX/OXI/CLI/TIA/MAR/NEO/SPE/ENO/TYL/TUL/TIL	3 (6,1)
P22	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/MAR/GEN/NEO/ENO/TYL/TIL	1 (2)
P23	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/MAR/GEN/NEO/TYL/TUL/TIL	1 (2)
P24	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/GEN/NEO/SPE/TYL/TUL/TIL	1 (2)
P25	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/MAR/NEO/ENO/SPE/TYL/TUL/TIL	4 (8,1)
P26	DOX/OXI/CLI/TIA/MAR/NEO/ENO/SPE/TYL/TUL/TIL/SUL	1 (2)
P27	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/MAR/ENO/GEN/NEO/SPE/TYL/TUL	1 (2)
P28	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/MAR/GEN/NEO/SPE/TYL/TUL/TIL	1 (2)
P29	DOX/OXI/CLI/TIA/FLOR/MAR/ENO/GEN/NEO/SPE/TYL/TUL/TIL	2 (4,2)
		49 (100)

6. DISCUSSÃO

Streptococcus dysgalactiae é considerada uma bactéria comensal de animais e humanos, entretanto é oportunista e potencialmente patogênica, e está associada a diversas doenças invasivas ou não de importância clínica. Todas as estirpes bovinas foram isoladas no estado de São Paulo, que responde por 5% da produção leiteira nacional e importa 38% do volume total de lácteos do país (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017). A base da cadeia de leite paulista é composta por produtores de diferentes níveis tecnológicos, distribuídos entre pequenos, médios e grandes produtores (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2018). No Brasil, dados mostram baixa prevalência de mastite clínica por *Streptococcus dysgalactiae*, representando entre 2 e 6% dos casos (BETTANIN *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2022; SALINA *et al.*, 2017; SOUTO *et al.*, 2011). Estudos europeus e asiáticos mostram uma prevalência entre 5 e 10%. Entretanto, LANGONI *et al.* (2011) encontrou 11,9% de prevalência em amostras de mastite subclínica coletadas em dez propriedades do estado de São Paulo. Ademais, muitos estudos classificam resultados microbiológicos de mastite como *Streptococcus* não *agalactiae* ou simplesmente do gênero *Streptococcus*. Logo, a prevalência de mastite por este agente pode ser subestimada.

A subespécie *dysgalactiae* é encontrado nas tonsilas, cavidade oral, trato reprodutivo (OLIVER; PIGHETTI, 2002), pele e em feridas (SMISTAD *et al.*, 2022) de bovinos. Apesar de MUSKENS, MAANEN e MARS (2011) isolarem a bactéria em 11% de amostras de útero de vacas com metrite, este quadro infeccioso é geralmente causado por infecções mistas por *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* e *Trueperella pyogenes* (ORDELL *et al.*, 2016). Já

as pododermatites infecciosas têm sido associadas à presença de *Treponema* spp. em associação com outros microrganismos, como *Bacteroides* spp., *Campylobacter* spp. e *Borrelia* spp. (KRULL *et al.*, 2014), e *Fusobacterium necrophorum* e *Dichelobacter nodosus* nos casos de pododermatite necrosante (SILVA *et al.*, 1999). O isolamento de *Streptococcus dysgalactiae* proveniente de metrite e pododermatite pode ser, portanto, exemplos de quadros de infecção oportunista. SMISTAD *et al.* (2022) também isolaram o agente de amostras obtidas das instalações e do ambiente, e estes locais podem exercer um papel importante na manutenção e transmissão de *S. dysgalactiae*.

As estirpes suínas foram isoladas em 75% dos casos no estado de Mato Grosso, o quinto maior produtor de suínos no país. A suinocultura do estado possui 75% da sua produção concentrada em criações comerciais e 25% em criações de subsistência (INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MATO GROSSO, 2019). Não há estudos sobre a prevalência ou impacto da infecção por *Streptococcus dysgalactiae* em suínos no Brasil. A subespécie *equisimilis* está presente em secreções nasais, tonsilas, secreções vaginais e prepuciais, e no leite (GOTTSCALK; SEGURA, 2019). Apesar da presença comensal da bactéria em secreções vaginais, RENZHAMMER *et al.* (2020) isolaram a subespécie em 49% do trato gênito-urinário de fêmeas com desordens reprodutivas ou aborto. POOR *et al.* (2022) identificaram *S. dysgalactiae* com maior frequência em porcas com descarga vaginal purulenta comparado às porcas saudáveis, porém sem diferença estatística. KIEFER *et al.* (2021) encontraram maior frequência de *S. dysgalactiae* em porcas com risco aumentado de prolapso de órgão pélvico. As metrites são o resultado de infecções por bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.,

Proteus spp.) ou gram-positivas (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp.; *Enterococcus* spp., *Trueperella pyogenes*) por falha de higiene durante o processo de inseminação e durante o parto (ALTHOUSE; KAUFFOLD; ROSSOW, 2019). Como quase 90% das amostras de suínos do presente estudo vieram de porcas com descarga vaginal purulenta, sugere-se uma provável associação etiológica de caráter oportunista.

Casos de pneumonia por *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis* são mais descritos em humanos, em que a provável origem seria pela aspiração da microbiota da orofaringe e redução das funções de deglutição e tosse em pacientes idosos (TAKAHASHI *et al.*, 2010). A bactéria também foi isolada de cavalos com histórico de doença respiratória semelhante à adenite equina (LAUS *et al.*, 2007), e faz parte da microbiota da pele e superfícies mucosas (TIMONEY, 2004). Em suínos, RENZHAMMER *et al.* (2020) também isolaram *S. dysgalactiae* no trato respiratório inferior de animais com manifestações clínicas. Logo, há um potencial envolvimento da bactéria no desenvolvimento de infecções respiratórias que deve ser investigado.

O diagnóstico de infecção por *Streptococcus dysgalactiae* pode ser feito por isolamento do agente e métodos moleculares baseados em DNA, como a PCR (KABELITZ *et al.*, 2021). Apesar da identificação fenotípica ser demorada e gerar resultados imprecisos (MORICONI *et al.*, 2017), muitos estudos fazem apenas a identificação bioquímica através de análises laboratoriais convencionais ou uso de kit comerciais (BAGCIGIL *et al.*, 2013; BENGSTSSON *et al.*, 2009; KATSUMI *et al.*, 1998; LUNDBERG *et al.*, 2016; MINST *et al.*, 2012; WENTE, KROMKER, 2020; ZORIC *et al.*, 2009).

A espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) é uma técnica de identificação rápida e com bom custo-benefício que é cada vez mais utilizada nos laboratórios de diagnóstico (KURBAN *et al.*, 2022). RENZHAMMER *et al.* (2020), DE OLIVEIRA *et al.* (2022) e WOULDSTRA *et al.* (2023) utilizaram apenas o MALDI-TOF para identificação de *Streptococcus dysgalactiae*. Alguns estudos atentam para possíveis limitações na identificação de algumas espécies pela similaridade dos perfis de proteína ribossomal. Essa similaridade parece ser observada entre *S. dysgalactiae*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus canis* e *Streptococcus pyogenes*. PEREZ-SANCHO *et al.* (2017) reportaram *S. equi*, *S. canis* ou *S. pyogenes* como segunda identificação mais provável em 5 de 8 isolados de *S. dysgalactiae*, com valor de especificidade de 37,5%. SCHULTHESS *et al.* (2013) também descreveram uma baixa taxa de identificação de *S. dysgalactiae* pelo MALDI-TOF utilizando a versão 2.0 da plataforma Biotyper. No presente estudo, alguns resultados obtidos apresentaram mistura (mix) entre as espécies *Streptococcus canis* e *Streptococcus dysgalactiae*. Com a finalidade de discriminar os possíveis casos de identificação duvidosa foi utilizada a PCR para confirmação da espécie *S. dysgalactiae*. Todas as estirpes foram positivas. Apesar desses casos em que a confirmação posterior se faz necessária, a triagem dos isolados pelo MALDI-TOF MS tem possibilitado a realização de estudos epidemiológicos em uma velocidade nunca imaginada anteriormente (MATAJIRA *et al.*, 2017; ALNAKIP *et al.*, 2020).

Outro método molecular utilizado para identificação de espécie e que permite a diferenciação entre as subespécies é o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (ALVES-BARROCO *et al.*, 2021; KASUYA *et al.*, 2014; MORENO *et al.*, 2016a; OH *et al.*, 2018; RATO *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*,

2018). Essa ferramenta é confiável e robusta para a identificação de membros do gênero *Streptococcus*, entretanto ainda tem um custo elevado por amostra e requer técnicos especializados para realização da análise (ALNAKIP *et al.*, 2020). A diferenciação da *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* e *S. dysgalactiae* subespécie *dysgalactiae* é realizada com maior segurança pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA ou sequenciamento do genoma completo. Há estudos propondo a diferenciação da subespécie *equisimilis* pela PCR, no entanto os primers descritos até o momento quando avaliados frente aos genomas da subespécie depositados nos bancos de dados não se mostram capazes de identificar todos os isolados (PREZIUSO *et al.*, 2010).

A determinação do tipo de hemólise é uma importante forma de identificação dos estreptococos, uma vez que essa característica costuma ser associada à patogenicidade dos isolados. Estirpes beta-hemolíticas, por exemplo, seriam mais virulentas. O agrupamento proposto para os isolados de *Streptococcus dysgalactiae* e suas subespécies deu-se de acordo não apenas por características fenotípicas, mas principalmente pelas espécies de origem (FACKLAM, 2022; QUINN *et al.*, 1999, BERT *et al.*, 1997). No presente estudo observou-se que todas as estirpes de origem bovina apresentaram alfa-hemólise (43/43) e a maioria das estirpes suínas apresentaram beta-hemólise (44/49), o que condiz com a classificação proposta por VIEIRA *et al.* (1998) que sugere associar as subespécies com o tipo de hemólise: a subespécie *equisimilis* apresenta beta-hemólise e a subespécie *dysgalactiae* alfa-hemólise. As estirpes isoladas de suínos apresentaram maior variação no padrão de hemólise, com quatro estirpes alfa-hemolíticas (4/49) e uma não hemolítica (1/49). Essa variação condiz com estudo de MORENO *et al.* (2016a), que avaliaram 17

isolados suínos de *S. dysgalactiae* e identificaram 14 estirpes de *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* (beta-hemolíticas) e 3 estirpes de *S. dysgalactiae* subespécie *dysgalactiae* (alfa-hemolíticas). Todavia, a subespécie *dysgalactiae* também pode produzir beta-hemólise (JENSEN; KILLIAN, 2012), portanto apenas o tipo de hemólise não é uma forma apropriada de classificação em subespécies. O uso apenas do tipo de hemólise para classificação na rotina laboratorial pode levar a erros de identificação (ALVES-BARROCO *et al.*, 2022).

Em 1984, FARROW e COLLINS propuseram a junção das espécies *S. dysgalactiae* e *S. equisimilis* em uma mesma espécie (*S. dysgalactiae*) devido as similaridades genômicas das estirpes nos estudos baseados em hibridização de DNA, e testes bioquímicos, sugerindo a criação de duas subespécies (*dysgalactiae* e *equisimilis*) dentro da espécie *dysgalactiae*. Entretanto, há uma grande variabilidade de características apresentadas pelas estirpes dentro da espécie, como tipo de hemólise, patogenicidade, potencial zoonótico e tipo de hospedeiro acometido. Estudos mais recentes de filogenia atestam importantes diferenças gerando algumas discussões na literatura atual. ALVES-BARROCO *et al.* (2021) encontraram maior homologia entre estirpes das subespécies *dysgalactiae* de espécies não-bovinas e subespécie *equisimilis* na análise filogenética por MLSA e pelo gene *SagA*. Isso implica em uma maior divergência das estirpes bovinas da subespécie *dysgalactiae* em relação às outras estirpes de *S. dysgalactiae* isoladas de outros hospedeiros. Ademais, XU *et al.* (2021) também encontraram maior homologia entre estirpes de *S. dysgalactiae* de origem suína, humana e de peixes, que formaram um cluster na árvore filogenética baseada no genoma core. As estirpes bovinas da subespécie *dysgalactiae* formaram um cluster separado. Por fim, PORCELLATO *et al.* (2021)

analisaram estirpes bovinas e ovinas da subespécie *dysgalactiae* e estirpes humanas, de cães, suínos, peixes e equinos da subespécie *equisimilis*. Eles concluíram que a divisão filogenética é muito mais extensa do que duas subespécies e apontam para uma adaptação evolutiva da espécie em várias linhagens associadas a diversos hospedeiros. Logo, mais estudos filogenéticos incluindo estirpes de *S. dysgalactiae* de diferentes espécies animais e humanas são necessários, assim como uma reconsideração da divisão entre as duas subespécies existentes atualmente.

A análise genotípica de estirpes de *S. dysgalactiae* pelo AFLP é pouco descrita na literatura até o momento (MORENO *et al.*, 2016a; MIONI *et al.*, 2018). No presente estudo foi possível avaliar todos os 92 isolados e discriminar 18 perfis distribuídos em dois agrupamentos principais com pouco mais de 75% de similaridade. Nesses agrupamentos houve a separação dos isolados de origem suína e de origem bovina em ramificações distintas. Os perfis A1 ao A10 correspondem aos isolados de origem suína e os perfis A11 ao A17 reúnem as estirpes de origem bovina. Duas estirpes de origem bovina provenientes de um animal com quadro de mastite se destacaram destes dois agrupamentos e foram isoladas em uma ramificação denominada perfil A18, com 65% de similaridade em relação às outras estirpes.

As estirpes de origem bovina parecem apresentar maior correlação entre os perfis e as propriedades de origem. Alguns perfis como A12, por exemplo, reúnem todas as amostras da fazenda 11, o perfil A15 reuniu todas as amostras da fazenda 10. As estirpes do perfil 18, provenientes da fazenda 9, se destacam de todo o conjunto, e apesar de serem alfa-hemolíticas e de origem bovina como as outras 41 avaliadas, podem se diferenciar das outras pelo antígeno do grupo

de Lancefield, por exemplo. Infelizmente, não foi possível fazer a avaliação dessa característica no momento.

Estudos anteriores de isolados de mastite por *S. dysgalactiae* mostram um caráter de transmissão ambiental, em que o mesmo perfil genotípico aparece em diversos rebanhos (BASEGGIO *et al.*, 1997; LUNDBERG *et al.*, 2014, RATO *et al.*, 2013). Isso ocorreria principalmente pelo trânsito de animais (LUNDBERG *et al.*, 2014) e pela mosca *Hydrotaea irritans*, que parece ter um papel na transmissão e na manutenção da mastite por *Streptococcus dysgalactiae* no norte da Europa e no Japão (KABELITZ *et al.*, 2021). O contágio também pode ser por contaminação de piquetes e camas (LANGONI *et al.*, 2011). Entretanto, de acordo com SMISTAD *et al.* (2022), o *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *dysgalactiae* é um patógeno oportunista que pode apresentar padrões mistos de infecções transientes por múltiplas estirpes e infecções persistentes por uma única estirpe (ZADOKS *et al.*, 2011). Diversos estudos encontraram esse padrão misto de perfis genotípicos idênticos em diferentes rebanhos e perfis genotípicos específicos para cada rebanho (LUNDBERG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 1999; WENTE e KROMKER, 2020; XU *et al.*, 2021).

No presente estudo, as estirpes bovinas de casos de mastite apresentaram agrupamentos com forte relação com o rebanho, reunidos em apenas 4 perfis genotípicos. Contrariamente, as estirpes de pododermatite foram agrupadas em perfis distintos no mesmo rebanho. Essa baixa diversidade dos isolados de mastite indica a transmissão entre animais e um caráter contagioso ou a transmissão por *hotspots* (WENTE; KROMKER, 2020). Estudos mais recentes têm encontrado padrão similar. WOULDSTRA *et al.* (2022) utilizando a tipagem por RAPD (Amplificação randômica de DNA polimórfico) encontraram 7 perfis

genotípicos, sendo que metade dos casos de mastite foi causado pelo mesmo perfil. SMISTAD *et al.* (2022) também encontraram baixa diversidade nos isolados de mastite comparados pelo sequenciamento do genoma. Todavia, o último estudo encontrou um mesmo perfil proveniente de amostras de mastite e de amostras extra mamárias, como o presente estudo, o que implica em uma transmissão entre os animais ou uma fonte ambiental de infecção. Além disso, a existência desses isolados extra mamários contribui para a permanência da bactéria no rebanho mesmo após o tratamento (SMISTAD *et al.*, 2022).

Conhecer o padrão de transmissão é importante para a definição de medidas de controle e prevenção. Para patógenos contagiosos, é importante melhorar a higienização durante a ordenha, tanto do animal como dos equipamentos, e na transmissão ambiental é importante a higienização de forma geral (WOUDSTRA *et al.*, 2022). O sistema de confinamento *Free Stall*, que é predominante no Brasil, está fortemente relacionado às infecções por *S. dysgalactiae* devido à livre movimentação dos animais e o contato direto e indireto entre eles (SMISTAD *et al.*, 2022). Outro sistema de produção que está se tornando mais frequente no Brasil é o *Compost Barn*, que traz melhora para o bem-estar animal, porém leva a uma maior frequência de mastites por microrganismos Gram-positivos (FREU *et al.*, 2023). Outro fator importante para esta infecção é o sistema automatizado e centralizado de ordenha (TAPONEN *et al.*, 2016).

Dentre as estirpes de origem suína não houve discriminação dos isolados que apresentaram diferentes padrões de hemólise (28.2, 64.2, 56, 88 e 91). Esses isolados foram distribuídos junto aos isolados beta-hemolíticos. Não foi observada separação de acordo com a granja de origem, apesar do perfil A5 reunir 17 (de 18) estirpes provenientes da granja 12.

A caracterização de 17 estirpes de origem suína pelo AFLP realizada por MORENO *et al.* (2016a) com estirpes provenientes de abscesso articular, urina e secreção vaginal, resultou em apenas três perfis genotípicos. A formação de dois clusters de acordo com as subespécies identificadas apresentou menos de 80% de similaridade. No presente estudo não foi realizada a caracterização da subespécie, porém o padrão de agrupamento com a separação das estirpes bovinas e suínas sugere essa divisão. A maior heterogeneidade das estirpes suínas do presente estudo contrasta com a homogeneidade intra subespécie do estudo de MORENO *et al.* (2016a). Este fato pode ser devido ao maior número de estirpes avaliadas, maior número de sítios de isolamento e das amostras serem mais recentes. A ocorrência de diversos perfis genotípicos serem isolados no mesmo rebanho e do mesmo perfil estar em rebanhos diferentes pode ser explicada pela introdução de animais infectados ou pela alta taxa de reposição de animais (DOTO *et al.*, 2016). Como a transmissão pode ocorrer por secreções vaginais, leite e contaminação de superfícies como o piso (GOTTSCHALK; SEGURA, 2019), a alta taxa de reposição de leitões, que hoje está em torno de 55% (MOURÃO, 2021), auxilia na introdução da bactéria e na maior variabilidade genética dentro do rebanho.

Streptococcus dysgalactiae é um dos agentes etiológicos mais comuns da mastite bovina e causa grandes perdas econômicas (SANTOS *et al.*, 2007). Essas perdas advêm da diminuição da produção e qualidade do leite, descarte do leite com resíduo antimicrobiano, descarte de animais e custos com veterinário e medicamentos (HALASA *et al.*, 2007). As mastites por estreptococos respondem bem ao tratamento por antimicrobianos e tem baixas taxas de cura espontânea (LANGONI *et al.*, 2017). Logo, o tratamento é

necessário para resolução do quadro clínico e recuperação do animal e da produção, entretanto o uso excessivo de antibióticos no gado de leite aumenta o risco de microrganismos resistentes (KABELITZ *et al.*, 2021).

As estirpes de origem bovina mostraram maior sensibilidade aos antimicrobianos do que as estirpes de origem suína. Doze estirpes foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados e os maiores níveis de resistência encontrados foram em relação aos aminoglicosídeos (neomicina e gentamicina), seguido de resistência intermediária à oxitetraciclina. Os estreptococos são pouco sensíveis aos aminoglicosídeos devido à limitada penetração pela parede celular (GLAZJNER; SZEWCZYK; SZEMRAJ, 2023), portanto possuem resistência intrínseca a essa classe de antimicrobianos. REIS, SILVA e BRESCIA (2003) isolaram 3 estirpes de mastite subclínica por *S. dysgalactiae* em um rebanho em Minas Gerais e observaram pouca eficiência dos aminoglicosídeos (abaixo de 60%). KACZOREK *et al.* (2017) e RATO *et al.* (2013) também reportaram resistência intermediária à gentamicina em, respectivamente, 41 e 18 isolados de mastite na Polônia e em Portugal. Estudos chineses observaram resistência intermediária a alta aos aminoglicosídeos. ZHANG *et al.* (2018) estudaram 88 isolados de mastite clínica e obtiveram 89,8% de frequência de resistência à kanamicina e 58% à estreptomina. SHEN *et al.* (2021) observaram mais de 70% de resistência aos aminoglicosídeos (gentamicina, kanamicina e estreptomina) em 60 isolados bovinos.

Entretanto, ULSENHEIMER *et al.* (2020) reportaram susceptibilidade de todos as 9 estirpes isoladas no noroeste do Rio Grande do Sul à gentamicina. MINST *et al.* (2012) também encontraram baixa resistência à gentamicina ao analisar 279 isolados de *Streptococcus* spp. na Alemanha. Esses estudos

utilizaram métodos diferentes de determinação do perfil de resistência: difusão em disco e microdiluição em caldo. O método de escolha para o teste de susceptibilidade é o teste de diluição, seguindo os padrões do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Entretanto, os pontos de corte para patógenos de medicina veterinária nem sempre estão disponíveis, e em alguns casos é necessário utilizar referências de outras espécies animais, outro grupo de bactérias e até o padrão da medicina humana (THOMAS *et al*, 2015). Além disso, a resistência aos aminoglicosídeos pode ser também ao uso excessivo e desregrado dos antimicrobianos nas mastites de ruminantes (KAZCOREK *et al.*, 2017). Como o uso de antimicrobianos é variável de acordo com o país e região estudada, a frequência de resistência ao antimicrobiano também será variável.

Em relação à tetraciclina, BENGTTSSON *et al.* (2009) encontraram resistência intermediária em 152 estirpes de *S. dysgalactiae* isoladas de mastite clínica na Suécia em uma distribuição bimodal das concentrações inibitórias mínimas. MINST *et al.* (2012) e ZHANG *et al.* (2018) também reportaram resistência intermediária de tetraciclina, ao redor de 26% e 33% de frequência respectivamente, valores próximos aos obtidos no presente estudo. Todavia, KAZCOREK *et al.* (2017) reportaram frequência de resistência de 61% e RATO *et al.* (2013) e SHEN *et al.* (2021) observaram resistência em 100% dos seus isolados. O programa de monitoramento francês de resistência aos antimicrobianos (RESPATH) encontrou mais de 85% dos isolados resistentes às tetraciclinas (HAENNI; LUPO; MADEC, 2018). Por fim, GUERIN-FAUBLEE *et al.* (2002) reportaram 91,5% de resistência à tetraciclina em isolados de *S. dysgalactiae* subespécie *dysgalactiae* na França. Importante observar que os estudos analisados utilizaram principalmente tetraciclina e o presente estudo,

oxitetraciclina. As tetraciclinas são antimicrobianos de amplo espectro e baixa toxicidade, e foram excessivamente utilizadas nos tratamentos de doenças respiratórias, entéricas e como promotores de crescimento em animais de produção (SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992).

Observou-se baixa frequência de resistência à clindamicina (13,9%), pertencente à classe das lincosamidas. O valor é próximo ao observado pelo programa de monitoramento francês de resistência aos antimicrobianos (RESPATH) à lincomicina, pertencente à mesma classe, com 12% (HAENNI; LUPO; MADEC, 2018). Entretanto, esses resultados contrastam com a literatura. Apesar de estudarem apenas um isolado, SANTOS *et al.* (2023) encontraram resistência à clindamicina em um isolado do estado do Rio Grande do Sul. Estudos europeus e chineses também mostram alta resistência às lincosamidas, como clindamicina e pirlimicina (BENGTSSON *et al.*, 2009; KAZCOREK *et al.* 2017; MINST *et al.* 2012; RATO *et al.* 2013; SHEN *et al.* 2021; TIAN *et al.*, 2019). A resistência às lincosamidas é provavelmente devida ao gene *linB*, que é conhecidamente carregado pelo plasmídeo de *Enterococcus faecium* (RATO *et al.*, 2013), por transferência horizontal de genes.

Apenas um isolado foi resistente à ampicilina e penicilina. Essa alta susceptibilidade às penicilinas é compatível com a literatura. BENGSTSSON *et al.* (2009) obtiveram baixos valores de CIM para penicilina. KACZOREK *et al.* (2017), MINST *et al.* (2012) e RATO *et al.* (2013) tiveram todos os seus isolados sensíveis à penicilina. OLIVEIRA *et al.* (2022) encontraram baixa frequência de resistência antimicrobiana com um isolado de *S. dysgalactiae* do estado do Piauí sensível à oxacilina e resistente apenas à eritromicina. Essa ausência de resistência indica que os beta-lactâmicos são ótimas opções terapêuticas que

não geraram resistência mesmo após o seu uso contínuo. Todavia, a susceptibilidade às penicilinas tem decrescido ao longo dos anos. ULSENHEIMER *et al.* (2020) reportaram 63% de susceptibilidade dos isolados à penicilina e ampicilina. TIAN *et al.* (2019) analisaram 64 isolados de *Streptococcus* das espécies *dysgalactiae*, *agalactiae* e *uberis*, e obtiveram 96 a 98% de frequência de resistência à penicilina e oxacilina.

As estirpes bovinas tiveram 100% de susceptibilidade à cefalosporina (ceftiofur) e fluoroquinolonas (enrofloxacina e marbofloxacina). ULSENHEIMER *et al.* (2020) também obtiveram 100% de susceptibilidade à cefalotina, enrofloxacina e ciprofloxacina, porém obtiveram 83% de susceptibilidade à cefalexina. Estudo americano com 1.627 estirpes de *S. dysgalactiae* de casos de mastite clínica e subclínica reportaram baixos valores de MIC para ampicilina e ceftiofur ($\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$) (LINDEMAN *et al.*, 2013). DE JONG *et al.* (2018) encontraram baixos valores de CIM 50 e 90 para ceftiofur e penicilina em 95 estirpes de *S. dysgalactiae* incluídas no programa de monitoramento europeu de susceptibilidade de patógenos causadores de mastite aos antimicrobianos. Estudos recentes encontraram resistência intermediária às cefalosporinas. TIAN *et al.* (2019) reportaram 59,38% de resistência à cefalotina e 31,25% à cefotaxime. ZHANG *et al.* (2017) foram os primeiros a reportar a resistência à ceftriaxona e cefalexina, com respectivamente 13,6 e 34,1% de frequência de resistência pelo provável aumento do uso no tratamento veterinário. SHEN *et al.* (2021) encontraram 45% de frequência de resistência à cefotaxime e 11,67% à cefepime. REIS, SILVA e BRESCIA (2003) trataram um caso de mastite por *S. dysgalactiae* com cefacetil, cefalosporina de primeira geração, e só obtiveram a cura microbiológica após 40 dias do início do tratamento. Nota-se a grande

variedade de antimicrobianos da classe das cefalosporinas e o crescente aumento da frequência de resistência. Futuros estudos devem incluir uma maior gama de antimicrobianos da classe das cefalosporinas. Em relação às fluoroquinolonas, baixa resistência é reportada (KACZOREK *et al.*, 2017; SHEN *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2018). DE JONG *et al.* (2018) encontraram altos valores de CIM 50 e 90 pra marbofloxacina e neomicina em relação ao presente estudo e valores idênticos para enrofloxacina (HAENNI; LUPO; MADEC, 2018).

Apenas seis estirpes bovinas (14%) foram multirresistentes, isto é, são resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. Estudos chineses reportaram maior frequência de multirresistência do que estudos europeus. TIAN *et al.* (2019) encontraram multirresistência em 100% dos isolados do gênero *Streptococcus*, e SHEN *et al.* (2021) em 81,67% dos isolados de *S. dysgalactiae*. Já MINST *et al.* (2012) obtiveram 6% de multirresistência, que era mais comum nas fazendas com maior número de animais. GUERIN-FAUBLEE *et al.* (2002) reportaram 4,8% de isolados multirresistentes, com perfil de resistência a tetraciclina, estreptomicina e kanamicina, isto é, as classes de antimicrobianos com maiores frequências de resistência no presente estudo.

Dos dez perfis de resistência obtidos para as estirpes bovinas, três estão relacionados à multirresistência e são compostos das classes das tetraciclinas e aminoglicosídeos. O perfil mais frequente, encontrado em quatro estirpes de pododermatite, tem resistência às tetraciclinas, aminoglicosídeos, lincosamida e macrolídeos (BEYI *et al.*, 2021).

Há também descrição na literatura de resistência intrínseca às sulfonamidas em amostras de leite (PORTER; KAPLAN, 2011; SWEDBERG; RINGERTZ; SKOLD, 1998). Os estudos apresentam resultados variáveis. BENGTSSON *et*

al. (2009) encontraram baixos valores de MIC para trimetoprima/sulfametoxazol. SHEN *et al.* (2021) reportaram 18,3% de frequência de resistência à sulfametoxazol, sem associação à trimetoprima. Entretanto, ZHANG *et al.* (2018) encontraram 83% de resistência às sulfonamidas. Dado os resultados do presente estudo, essa classe pode ser uma importante alternativa terapêutica.

As estirpes suínas estudadas apresentaram 100% de resistência às tetraciclinas. Altos valores de concentração inibitória mínima (CIM) ou resistência foram reportados por alguns estudos, inclusive do Brasil. MORENO *et al.* (2016a) apresentaram MIC > 8 µg/mL para oxitetraciclina ao estudar 17 isolados suínos de *S. dysgalactiae* provenientes de descarga vulvar, urina e artrite de diferentes estados do país. Dois estudos japoneses de mesma autoria com isolados de *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* provenientes de leitões com sinais neurológicos e claudicação obtiveram o mesmo valor de MIC para oxitetraciclina (OH *et al.*, 2018, 2020). RENZHAMMER *et al.* (2020), na Áustria, usando método de difusão em disco, obtiveram 62% de resistência à tetraciclina em 143 isolados de *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* provenientes de diferentes sítios de isolamento (RENZHAMMER *et al.*, 2020). Um relato de caso japonês de meningoencefalomielite por *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* também foi resistente à tetraciclina pelo método de difusão de disco (KASUYA *et al.*, 2014). Para *Streptococcus suis*, bactéria do mesmo gênero de importância zoonótica e uma das maiores causas do uso de antimicrobianos em leitões, estudos mostram resistência à tetraciclina de 99,3% (SEGURA *et al.*, 2020). Estudo brasileiro com 50 isolados de espécies de *Streptococcus* não *suis* reportaram CIM > 16 µg/ml para oxitetraciclina exceto para *S. sanguinis* e *S. mitis* (MORENO *et al.*, 2016b). As tetraciclinas são uma classe de antimicrobianos que foi muito utilizada como

promotor de crescimento e no tratamento profilático de animais de produção via ração (SHERLEY; GORDON; COLLIGNON, 2004). Portanto, altos índices de resistência são sempre reportados para estreptococos de origem suína; para *S. suis*, espécie para qual que se tem mais dados, a resistência descrita é acima de 90% (HAENNI, LUPO, MADEC, 2018).

As estirpes suínas também foram todas resistentes à clindamicina. Estudo brasileiro e japonês obtiveram MIC > 16 µg/ml para clindamicina (MORENO *et al.*, 2016a; OH *et al.*, 2018). Por método de difusão de disco, RENZHAMMER *et al.* (2020) encontraram 59% de resistência à clindamicina. Já estudo brasileiro com diferentes espécies de *Streptococcus* encontraram valores de MIC > 32 µg/ml, exceto para *S. sanguinis* e *S. mitis* (MORENO *et al.*, 2016b). Para *Streptococcus suis*, alta frequência de resistência à clindamicina também é reportada. SOARES *et al.*, (2014) avaliando 260 estirpes de *S. suis* isoladas no Brasil de animais clinicamente saudáveis reportou taxa de resistência de 84,61%. Em estudo na Tailândia comparando 262 estirpes de *S. suis* entre os períodos de 2006-2007 e 2012-2015, foi descrito resistência à clindamicina de 87 a 96% das cepas analisadas (YONGKIETTRAKUL *et al.*, 2019). Assim como as tetraciclina, as lincosamidas, classe de antimicrobianos a qual pertencente a clindamicina, são muito utilizadas na suinocultura pelo seu amplo espectro de ação (URUEN *et al.*, 2022). Apesar de não serem utilizadas especificamente para tratamento de estreptococoses, lincosamidas podem ser usadas em combinação com penicilinas para tratamento de infecções (DECHENE-TEMPIER *et al.*, 2021).

A tiamulina apresentou frequência de resistência de 95,9% no presente estudo. MORENO *et al.* (2016a) e OH *et al.* (2018) também reportaram alto valor

de CIM, $>32 \mu\text{g/ml}$. Este antimicrobiano é comumente utilizado como promotor de crescimento e no tratamento profilático dos animais, via ração, principalmente nas fases de crescimento e terminação (BOSMAN *et al.*, 2022). Ele também é utilizado para tratamento de infecções por bactérias gram-negativas respiratórias, como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Glasserella parasuis* (NEDBALCOVA *et al.*, 2022). Para *Streptococcus suis*, a tiamulina é um antimicrobiano eficaz (URUEN *et al.*, 2022). Em estudo de MATAJIRA (2019) com 215 estirpes de *S. Suis* isoladas de diversos estados brasileiros, a tiamulina foi um dos antimicrobianos mais eficazes. Porém, a frequência de resistência vem aumentando nos últimos anos e ele não é mais considerado uma opção no tratamento de infecções por *Streptococcus* spp. LUNHA *et al.* (2022) encontraram frequência de resistência de 79,3% em 246 isolados de *S. suis* na Tailândia, enquanto estudo feito na República Tcheca com 506 isolados obteve frequência crescente de resistência entre os anos de 2018 à 2022 de 38,3 a 48,7% (NEDBALCOVA *et al.*, 2022). Outras espécies de *Streptococcus* apresentaram resistência variável; enquanto estirpes de *S. plurianimalium* apresentaram CIM90 $> 64 \mu\text{g/ml}$, *S. sanguinis* e *S. mitis* tiveram CIM90 respectivamente de $\leq 0,5$ e $2 \mu\text{g/ml}$.

Altas taxas de resistência também foram reportadas para os aminoglicosídeos (acima de 80%) exceto gentamicina (28,6%). MORENO *et al.* (2016a) e OH *et al.* (2018) também encontraram resistência variável entre os aminoglicosídeos, com altos valores de CIM para neomicina ($32 \mu\text{g/ml}$) e espectinomicina ($> 64 \mu\text{g/ml}$). Em relação à gentamicina, enquanto MORENO *et al.* (2016a) obtiveram valor intermediário (CIM50 de $4 \mu\text{g/ml}$), OH *et al.* (2018) obtiveram valores médios de 8 e $> 16 \mu\text{g/ml}$. Para *Streptococcus suis*, observa-

se alta frequência de resistência para espectinomicina e resistência intermediária para gentamicina e neomicina (MATAJIRA, 2019). Para *Streptococcus* não *suis*, alto valor de CIM para estreptomicina também foi encontrado na maioria das espécies (MORENO *et al.*, 2016b). Devido á resistência intrínseca, apenas alguns antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos são efetivos contra as bactérias do gênero *Streptococcus*, como tobramicina, e em maiores concentrações (URUEN *et al.*, 2022). Os aminoglicosídeos são comumente usados em combinação com as penicilinas para tratamento na medicina veterinária pelo seu grande sinergismo (LUNHA *et al.*, 2022).

A classe dos macrolídeos apresentou alta frequência de resistência, entre 69% e 78%. Altas frequências de resistência aos macrolídeos são reportadas na literatura. MORENO *et al.* (2016a) encontraram 82,3% de resistência para tilosina, tulatromicina e tilmicosina. OH *et al.* (2018, 2020) também encontraram altos valores de CIM para os mesmos antimicrobianos. Estudos que testaram eritromicina tiveram resistência variável, de 36% de resistência (RENZHAMMER *et al.*, 2020) à alta resistência (KASUYA *et al.*, 2014). Um estudo belga analisou 33 suabes de tonsila e 99 suabes de carcaça de suínos, e identificou 95% e 85% de resistência à eritromicina e tilosina, respectivamente. Apenas um isolado de carcaça de *S. dysgalactiae* foi resistente à eritromicina, porém sensível à tilosina (MARTEL *et al.*, 2002). A alta frequência de resistência aos macrolídeos também é observada em *S. suis* em diversos países do mundo (LUNHA *et al.*, 2022), o que ocorre desde os anos de 1980 (SEGURA *et al.*, 2020). Isso limita o seu uso no tratamento de estreptococoses (NEDBALCOVA *et al.*, 2022). Macrolídeos têm um amplo espectro de ação, com boa penetração nos tecidos e poucos

efeitos colaterais (HAENNI; LUPO; MADEC, 2018) e são antimicrobianos comumente utilizados na medicina veterinária.

As fluoroquinolonas testadas apresentaram resistência intermediária, entre 28 e 45%, assim como o florfenicol (32,6%). MORENO *et al.* (2016a) e OH *et al.* (2018, 2020) obtiveram os mesmos valores de CIM50 do presente estudo para enrofloxacin. Os estudos recentes mostram alta frequência de resistência à danofloxacin (MORENO *et al.* 2016a; OH *et al.* 2020), fluoroquinolona sintética da terceira geração com amplo espectro de atividade e que foi usada de forma intensiva na suinocultura mundial (YANG *et al.* 2019), porém não testada no presente estudo. Outro antimicrobiano da mesma classe, a levofloxacin, foi testado em 143 isolados de *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* e apenas 1 obteve resistência. (RENZHAMMER *et al.*, 2020). Para *S. suis*, frequências intermediárias têm sido observadas para enrofloxacin, levofloxacin e danofloxacin na Europa, e de intermediária para alta na Ásia (DECHENE-TEMPIER *et al.*, 2021; LUNHA *et al.*, 2022; URUEN *et al.*, 2022), o que pode levar à resistência pelo seu uso contínuo. Estudos brasileiros de *S. suis* também mostram alta frequência de resistência às fluoroquinolonas (MATAJIRA, 2019; SOARES *et al.*, 2014).

Em relação ao florfenicol, MORENO *et al.* (2016) observaram o mesmo valor de CIM50 do que o presente estudo, já OH *et al.* (2018) reportaram valor maior de 4 µg/ml. O único isolado analisado por KASUYA *et al.* (2014) mostrou sensibilidade ao cloranfenicol. Para *S. suis*, o florfenicol é um dos antimicrobianos mais eficazes, com baixa resistência reportada (LUNHA *et al.*, 2022; MATAJIRA, 2019; NEDBALCOVA *et al.*, 2022).

Por fim, todas as estirpes suínas foram suscetíveis aos beta-lactâmicos (penicilina, ampicilina e ceftiofur) e à trimetoprima/sulfadimetoxazol, e apenas 10,2% foram resistentes à sulfadimetoxina. Baixos valores de CIM dos beta-lactâmicos foram reportados na literatura (KASUYA *et al.*, 2014; MORENO *et al.*, 2016a; OH *et al.*, 2018, 2020; RENZHAMMER *et al.*, 2020) de acordo com o presente estudo. Em relação às sulfonamidas, MORENO *et al.* (2016a) e OH *et al.* (2018) encontraram 100% de resistência à sulfadimetoxina. Em estudo de frequência de resistência de *Streptococcus* não *suis* no Brasil, altos valores de CIM foram reportados para as sulfonamidas, principalmente sulfadimetoxina (MORENO *et al.*, 2016b). As sulfonamidas possuem amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (URUEN *et al.*, 2022) e são de baixo custo. Apesar de serem a primeira classe de agentes antimicrobianos descobertos na terapêutica, o uso na medicina veterinária é frequente, principalmente no tratamento profilático em suínos (HOFF *et al.*, 2015).

O tratamento de escolha para as estreptococoses tanto em animais como em humanos é o uso de antibióticos beta-lactâmicos, como penicilinas e ampicilinas (KABELITZ *et al.*, 2021). De acordo com os resultados deste estudo, os beta-lactâmicos devem permanecer como tratamento de primeira escolha. Os aminoglicosídeos também podem ser administrados junto com os beta-lactâmicos pois estes aumentam a permeabilidade da parede celular (TABER *et al.*, 1987), contornando a resistência intrínseca. As sulfonamidas também são outra opção terapêutica importante. Semelhante aos animais, em humanos há resistência aos macrolídeos e alta resistência às tetraciclina, que não são mais consideradas uma opção terapêutica (BRANDEN; SPELLENBERG, 2009).

Todas as estirpes suínas do presente estudo são multirresistentes, isto é, resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo que 53% são resistentes a seis ou mais classes das nove estudadas. Apesar dos estudos disponíveis não avaliarem multirresistência, estirpes de *S. dysgalactiae* subespécie *equisimilis* tendem a ter resistência conjunta à tetraciclina, eritromicina e clindamicina (RENZHAMMER *et al.*, 2020). Em estudo belga que analisou 33 suabes de tonsila de animais vivos e 99 suabes de carcaça para diversas espécies de estreptococos, inclusive *S. dysgalactiae*, o fenótipo de resistência predominante foi a corresponsabilidade entre macrolídeos, lincosamidas e esteptogramina B (MLSb) (MARTEL *et al.*, 2003). Curiosamente, os 29 perfis de resistência obtidos mostraram alta heterogeneidade, em que as altas taxas de uso de antimicrobianos diversos criaram diferentes perfis. O perfil mais frequente, P9, com 14,3% das estirpes, agrupa resistência às classes das tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas (clindamicina) e tiamulina, justamente as classes de antimicrobianos mais utilizadas. Algumas dessas drogas, amplamente utilizadas em suinocultura, são consideradas pela Organização Mundial de Saúde como muito importantes ou criticamente importantes para a medicina humana (HOLMAN; CHENIER, 2015). As altas taxas de resistência encontradas nessas estirpes representam um alerta sobre os riscos da transferência de genes de resistência para outras espécies bacterianas, para outras espécies animais, para os seres humanos e o risco de infecções de caráter zoonótico.

7. CONCLUSÕES

- As estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* de origem bovina e suína foram discriminadas pelo AFLP em dois agrupamentos distintos;
- Tendo em vista o padrão de hemólise observado nas estirpes avaliadas, os isolados de *S. dysgalactiae* de origem bovina provavelmente pertencem a subespécie *dysgalactiae*, enquanto os isolados de origem suína em sua grande maioria pertencem a subespécie *equisimilis*;
- Os padrões de resistência observados nas estirpes de *S. dysgalactiae* de origem bovina e de origem suína foram muito distintos, sendo 14% das estirpes bovinas multirresistentes, enquanto 100% das estirpes de origem suínas foram multirresistentes.
- As estirpes de origem suína apresentaram maior diversidade genética pelo AFLP e maior número de perfis de resistência, quando comparadas as estirpes de origem bovina. Este achado pode estar relacionado com características dos sistemas de produção das duas espécies animais ou com características das subespécies bacterianas envolvidas.
- Todas as estirpes avaliadas, independente da espécie de origem, foram sensíveis a ceftiofur e apenas uma estirpe foi resistente a penicilina e amoxicilina, indicando que os antimicrobianos beta-lactâmicos podem ser a melhor escolha para o controle das infecções pelo agente independente da subespécie.

REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, M.; ASHEG, A.; EISSA, A. E. *Streptococcus dysgalactiae*: an emerging pathogen of fishes and mammals. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 1, n., 2013, p. 1-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.04.002>. Acesso em: 22 de Maio de 2023.
- ABDELSALAM, M.; CHEN, S. C.; YOSHIDA, T. Phenotypic and genetic characterization of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from fish collected in Japan and other Asian countries. **FEMS Microbiology Letters**, v. 302, 2010, p. 32–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01828.x>. Acesso em: 23 de Maio de 2023.
- ALNAKIP, M. E. A.; *et al.* Discrimination of major and minor streptococci incriminated in bovine mastitis by MALDI-TOF MS fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. **Research in Veterinary Science**, v. 132, 2020, p. 426 – 438. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.027>. Acesso em: 23 de Junho de 2023.
- ALTHOUSE, G. C.; KAUFFOLD, J.; ROSSOW, S. Diseases of the reproductive system. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN J.J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. (ed.). **Diseases of Swine**. 10ª edição. Ames: Blackwell Publishing Professional; 2019. p. 373 -392.
- ALVES-BARROCO, C.; BRITO, P. H.; SANTOS-SANCHES, I.; FERNANDES, A. R. Phylogenetic analysis and accessory genome diversity reveal insight into the evolutionary history of *Streptococcus dysgalactiae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.952110>. Acesso em: 5 de Julho de 2023.
- ALVES-BARROCO, C., CAÇO, J.; ROMA-RODRIGUES, C.; *et al.* New Insights on *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Isolates. **Frontiers in Microbiology**, v.12, 2021. Disponível em: doi.org/10.3389/fmicb.2021.686413. Acesso em: 24 de Maio de 2023.
- ARMISTEAD, B.; OLER, E.; WALDORF, K. A.; RAJAGOPAL, L. The double life of Group B Streptococcus: Asymptomatic colonizer and potent pathogen. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n.16, 2019, p. 2914 – 2931. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.035>. Acesso em: 01 de Junho de 2023.
- ASBAUGH, C. D., *et al.* Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n., 1998, p. 550–560. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI3065>. Acesso em: 21 de Maio de 2023.
- BAGCIGIL, A.; *et al.* Isolation of *Streptococcus* species from the tonsils of slaughtered pigs. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 37,

2013, p. 94 – 96. Disponível em: <https://doi.org/10.3906/vet-0911-237>. Acesso em: 16 de Junho de 2023.

BALAMURUGAN, N.; *et. al.* *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* infection presenting with septic shock. **Cureus**, v. 13, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7759/cureus.12465>. Acesso em: 21 de Junho de 2023.

BARBA, M.; *et. al.* Vaginal microbiota is stable throughout the estrous cycle in Arabian mares. **Animals**, v. 10, n. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10112020>. Acesso em: 3 de Junho de 2023.

BARROS, R. R. Antimicrobial resistance among beta-hemolytic *Streptococcus* in Brazil: an Overview. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, 2021. Disponível em: [10.3390/antibiotics10080973](https://doi.org/10.3390/antibiotics10080973). Acesso em: 16 de Junho de 2023.

BASSEGIO, N.; MANSELL, P. D.; BROWNING, J. W.; BROWNING, G. F. Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. **Molecular and Cellular Probes**, v. 11, n. 5, 1997, p. 349 – 354. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/mcpr.1997.0126>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.

BAUMGARTNER, M.; GIFFINGER, F.; HOPPE, J.; SPERGSEER, J. Outbreak of subclinical mastitis due to beta-hemolytic group L streptococci (*S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*) in an Austrian dairy herd. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 124, n. 5-6, 2011, p. 217 – 224. Disponível em: <https://doi.org/10.2376/0005-9366-124-217>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

BEACHEY, E. H., *et. al.* Type-specific protective immunity evoked by synthetic peptide of *Streptococcus pyogenes* M protein. **Nature**, v. 292, 1981, p.457–459.

BEALL, B., *et. al.* Survey of *emm* Gene Sequences and T-Antigen Types from Systemic *Streptococcus pyogenes* Infection Isolates Collected in San Francisco, California; Atlanta, Georgia; and Connecticut in 1994 and 1995. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, 1997, p.1231–1235. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.35.5.1231-1235.1997>. Acesso em: 22 de Maio de 2023.

BECKER, A. A. M. J.; *et. al.* The Endometrial Microbiota – 16s rRNA Gene Sequence Signatures in Healthy, Pregnant and Endometritis Dairy Cows. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 3, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci10030215>. Acesso em: 3 de Junho de 2023.

BENGSTSSON, B.; *et. al.* Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 136, 2009, p. 142 – 149. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.024>. Acesso em: 22 de Junho de 2023.

- BENTLEY, R. W.; LEIGH, J. A.; COLLINS, M.D. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small subunit rRNA sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology** v. 41, n. 4, 1991, p. 487–494. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-41-4-487>. Acesso em: 25 de Maio de 2023.
- BERT, F.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Pulse-Field Gel Electrophoresis is more discriminating than Multilocus Enzyme Electrophoresis and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis for typing pyogenic *Streptococci*. **Current Microbiology**, v. 34, 1997, p. 226 – 229. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s002849900173>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.
- BERT, F.; BRANGER, C.; POUTREL, B.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Differentiation of human and animal strains of *Streptococcus dysgalactiae* by pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, n. 1, 1997, p. 107 – 112. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10357.x>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.
- BETTANIN, J.; VIRMOND, M. P.; FRANCISCATO, C.; BETO, A. F. D. Frequency of isolation of the bovine mastitis pathogens from southwest of Parana. **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanitary**, v. 13, n. 4, 2020, p. 440 – 451.
- BEYI, A.; HASSALL, A.; PHILLIPS, G. J.; PLUMMER, P. J. Tracking reservoirs of antimicrobial resistance genes in a complex microbial community using metagenomic Hi-C: the case of bovine digital dermatitis. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020221>. Acesso em: 6 de Julho de 2023.
- BOSMAN, A. L.; DECKERT, A. E.; CARSON, C. A.; et al. Antimicrobial use in lactating sows, piglets, nursery, and grower-finisher pigs on swine farms in Ontario, Canada during 2018 and 2018. **Porcine Health Management**, v. 8, 2022. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s40813-022-00259-w>. Acesso em: 9 de Julho de 2023.
- BOTREL, M. A, *et. al.* Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in Dairy Cows in Rhône-Alpes, France. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n°5, 2010, p. 479–487. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ fpd.2009.0425>. Acesso em: 27 de Maio de 2023.
- BRANDT C. M.; SPELLENBERG, B. Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. **Clinical Infectious Diseases**; v. 49, 2009, p.766–772. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/605085>. Acesso em: 25 de Maio de 2023.
- CALVINHO, L. F.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 61, n. 1-2, 1998, p. 93 – 110. Disponível em:

[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00172-2). Acesso em: 21 de Junho de 2023.

CAMERON, M.; *et al.* Short communication: evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and a custom reference spectra expanded database for the identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, 2018, p. 590- 595. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13226>. Acesso em: 23 de Junho de 2023.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; SACY, A.; KARGES, K.; APPER, E. Gastro-intestinal microbiota in Equines and its role in health and disease: the black box opens. **Microorganisms**, v. 10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122517>. Acesso em: 3 de Junho de 2023.

CHENNAPRAGADA S. S., Ramphul K., Barnett B. J., Mejias S. G., Lohana P. A Rare Case of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Human Zoonotic Infection. **Cureus**, v. 10, 2018, Disponível em: <https://doi.org/10.7759/cureus.2901>. Acesso em: 29 de Maio de 2023.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 5th edition**. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: CLSI, 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 32nd edition**. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI, 2022.

COSTA, F. A. A.; LEAL, C. A. G.; LEITE, R. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Genotyping of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 37, n°5, 2014, p. 463-469. Disponível em: [https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jfd.12125](https://doi.org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jfd.12125). Acesso em: 25 de Maio de 2023.

CUNNINGHAM, M. W. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, 2000, p. 470-511. Disponível em: [10.1128/cmr.13.3.470-511.2000](https://doi.org/10.1128/cmr.13.3.470-511.2000). Acesso em: 28 de Maio de 2023.

DA SILVA, M. C.; *et al.* Prevalência de Salmonella sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, 2009, p. 266 – 268. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000035>. Acesso em: 21 de Junho de 2023.

DE JONG, A.; *et al.* Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. **Veterinary Microbiology**, v. 213, 2018, p. 73 - 81. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.021>. Acesso em: 27 de Junho de 2023.

DECHENE-TEMPIER, M.; MAROIS-CREHAN, C.; LIBANTE, V.; *et al.* Update on the Mechanisms of antibiotic resistance and the mobile resistome in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081765>. Acesso em: 7 de Julho de 2023.

DEVRIESE, L. A. Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 6, 1991, p. 478 – 483. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb03821.x>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

DIERNHOFER, K. Aesculinbouillon als holfsmittel fur die differenzierung von euterund milchstreptokokken bei massenuntersuchungen. *Milchwirtsch. Forsch.*, v. 3, 1932, p. 368–374.

DOS SANTOS, E. M. P.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C.; *et al.* *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 1, 2007, p. 17 – 27. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289021848002>. Acesso em: 6 de Julho de 2023.

DOS SANTOS, J. B.; POSSIDONIO, B. I. O.; OLIVEIRA, H. G. D.; *et al.* Pododermatite em bovinos: revisão de literatura. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 15, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i15.37027>. Acesso em: 6 de Julho de 2023.

DOKUZEYLUL, B.; METINER, K.; KAHRAMAN, B. B.; KAYAR, A.; OZGUR, N. Y. Early detection of septic arthritis caused by *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* in a dog – a case report. **Acta Veterinaria Brno**, v. 83, n. 3, 2014, p. 261 – 264. Disponível em: <https://doi.org/10.2754/avb201483030261>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

DOTO, D. S.; *et. al.* Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotype 2 isolated from pigs in Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 2, 2016, p. 106 – 111.

DUNCAN, J. L.; SCHLEGEL, R. Effect of Streptolysin O on Erythrocyte Membranes, Liposomes, and Lipid Dispersions. **The Journal of Cell Biology**, v. 67, n.1,1975, p. 160 – 173. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.67.1.160>. Acesso em: 31 de maio de 2023.

DUTRA, M.; MORENO, L. Z.; DIAS, R. A.; MORENO, A. M. Antimicrobial use in Brazilian swine herds: Assessment of use and reduction examples. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040881>. Acesso em: 12 de Junho de 2023.

EFSTRATIOU, A.; *et al.* Biochemical differences among human and animal streptococci of Lancefield group C or group G. **Journal of Medical Microbiology**, v. 41, 1994, p. 145 – 148. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00222615-41-2-145>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

EFSTRATIOU, A.; LAMAGNI, T.; TURNER, C. E. Streptococci and enterococci. In: COHEN, J.; POWDERLY, W. G.; OPAL, S. M. (ed.) **Infectious Diseases**. 4th edition. Pequim: Elsevier, 2017, v.2, p. 1523 – 1536.

EROL, E.; *et al.* Beta-hemolytic *Streptococcus* sp. from horses: a retrospective study (2000-2010). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 1, 2012, p. 142 – 147. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1177/1040638711434138>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

FACKLAM, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, 2002, p. 613–630. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.15.4.613-630.2002>. Acesso em: 23 de Maio de 2023.

FACKLAM, R. F., *et al.* Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: emm103 to emm124. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, 2002, p. 28–38. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/324621>. Acesso em: 26 de Maio de 2023.

FARROW, J. A. E.; COLLINS, M. D. Taxonomic studies on streptococci of serological groups C, G and L and possibly related taxa. **Systemic and Applied Microbiology**, v. 5, n. 4, 1984, p. 483 – 493. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(84\)80005-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80005-3). Acesso em: 5 de Junho de 2023.

FERRETI, J.; KOHLER, W. History of Streptococcal Disease. In: FERRETTI, J.; STEVENS, D. L.; FISCHETTI, V. (ed.) **Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations**. 1ª edição. Oklahoma City: University of Okhaloma Health Science Center, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333430/#top>. Acesso em 1 de Junho de 2023.

FREU, G.; GARCIA, B. L. N.; TOMAZI, T.; *et al.* Association between mastitis occurrence in Dairy cows and bedding characteristics of compost-bedded pack barns. **Pathogens**, v. 12, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens12040583> . Acesso em: 5 de Julho de 2023.

FRY, N. K.; SAVELKOUL, P. H. M.; VISCA, P. Amplified Fragment Length Polymorfism Analysis. In: CAUGANT, D. A. (ed.). **Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols**. 1ª edição, Humana Totowa: Humana Press, 2009, p. 89 – 104.

GAO, J.; BARKEMA, H. W.; ZHANG, L. M., et al. Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n°6, 2017, p. 4797–4806. Disponível em: 10.3168/jds.2016-12334. Acesso em: 27 de Maio de 2023.

GARVIE, E. I.; FARROW, J. A. E.; BRAMLEY, A. J. *Streptococcus dysgalactiae* nom, rev. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 33, n. 2, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-33-2-404>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

GHERARDI, G.; et. al. Genetic diversity and virulence properties of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 1, 2014, p. 90 – 98. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.062109-0>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.

GLAJZNER, P.; SZEWCZYK, E. M.; SZEMRAJ, M. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in Streptococci isolated from human and animal clinical specimens. **Current Microbiology**, v. 80, 2023. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00284-023-03337-6>. Acesso em: 19 de Junho de 2023.

GLAZUNOVA O. O., Raoult D. e Roux V. Partial sequence comparison of the *rPoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes with the genus *Streptococcus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 9, 2009, p. 2317-22. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.005488-0>. Acesso em: 24 de Maio de 2023.

GUERIN-FAUBLEE, V.; TARDY, F.; BOUVERON, C.; CARRET, G. Antimicrobial susceptibility of Streptococcus species isolated from clinical mastitis in dairy cows. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 19, n. 3, 2022, p. 219 - 226. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00485-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00485-X). Acesso em: 6 de Julho de 2023.

GOTTSCHALK, M.; SEGURA, M. Streptococcosis. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN J.J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. (ed.). **Diseases of Swine**. 10ª edição. Ames: Blackwell Publishing Professional; 2019. p. 841-855.

GUZMAN, E.; ROMEU, A.; GARCIA-VALLVE, S. Completely sequenced genomes of pathogenic bacteria: a review. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 2, 2008, p. 88 – 98. Disponível em: <https://doi.org/10.1157/13115544>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.

HAENNI, M.; LUPO, A.; MADEC, J. Y. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n.2, 2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017>. Acesso em: 1 de Junho de 2023.

HAKANSSON, A.; BENTLEY, C. C.; SHAKHNOVIC, E. A.; WESSELS, M. R. Cytolysin-dependent evasion of lysosomal killing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 14, 2005, p. 5192 – 5197. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0408721102>. Acesso em: 31 de maio de 2023.

HALASA, T.; HUJIPS, K.; OSTERAS, O.; et al. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Veterinary Quarterly*, v. 29, n. 1, 2007, p. 18 - 31. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>. Acesso em: 6 de Julho de 2023.

HASHIKAWA, S.; et al. Characterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 1., 2004, p. 186 – 192. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.42.1.186-192.2004>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

HASLAM, D. B; ST GEME III, J. W. Groups C and G Streptococci. In: LONG, S. S.; PROBER, C. G.; FISCHER, M. (ed.) **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**. 5ª edição. Philadelphia: Elsevier; 2018, p.736-738.

HIJAZIN M., et al. Identification of *Trueperella (Arcanobacterium) bernardiae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis and by species-specific PCR. *Journal of Medical Microbiology*, v.61, 2012, p. 457–459. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.022>. Acesso em: 12 de Junho de 2023.

HOFF, R. B.; PIZZOLATO, T. M.; PERALBA, M.; et al. Determination of sulfonamide antibiotics and metabolites in liver, muscle and kidney samples by pressurized liquid extraction or ultrasound-assisted extraction followed by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC-QqLIT-MS/MS). *Talanta*, v. 134, 2015, p. 768–778.

HOLMAN, D. B.; CHENIER, M. R. Antimicrobial use in swine production and its effect on the swine gut microbiota and antimicrobial resistance. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 61, n. 11, 2015, p. 785 – 798. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1139/cjm-2015-0239>. Acesso em: 7 de Julho de 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA)**: Pesquisa da pecuária municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2017.

INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MATO GROSSO. **Base de dados SINDESA – INDEA**. Cuiabá: INDEA/MT, 2019.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Diagnóstico de Produção e Consumo de leite no Estado de São Paulo**. São Paulo: IEA, 2018.

JENSEN, A.; KILLIAN, M. Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies, and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 1, 2012, p. 113–126. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.05900-11>. Acesso em: 24 de Maio de 2023.

JOHNSON, D. R.; KAPLAN, E. L. A review of the correlation of T-agglutination patterns and M-protein typing and opacity factor production in the identification of group A streptococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 38, 1995, p. 311–315. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00222615-38-5-311>. Acesso em: 25 de Maio de 2023.

JORDAL, S.; GLAMBEK, M.; OPPEGARD, O.; KITTING, B. R. New Tricks from an Old Cow: Infective Endocarditis Caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n°2, 2015, p. 731-734. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.02437-14>. Acesso em: 26 de Maio de 2023.

KABELITZ, T.; *et. al.* The role of *Streptococcus* spp. In bovine mastitis. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497>. Acesso em: 12 de Junho de 2023.

KASUYA, K., *et. al.* Systemic *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis* infection in Yorkshire pig with Severe Disseminated Suppurative Meningoencephalomyelitis. **Pathology**, v. 76, n.5, 2014, p. 715-18. Disponível em: <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0526>. Acesso em: 25 de Maio de 2023.

KAWATA, K.; *et. al.* rRNA sequence analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from pigs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Biology**, v. 53, 2003, p. 1941 – 1946. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijls.0.02666-0>. Acesso em: 20 de Maio de 2023.

KAZCOREK, E.; *et. al.* Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. Isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, 2017, p. 6442 – 6453. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12660>. Acesso em: 22 de Junho de 2023.

KELLERMAN, C.; MALALUNG, P.; HANSSON, I.; *et al.* Antibiotic resistance patterns in cervical microbes of gilts and sows. **Animals**, v. 12, n.1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani12010117>. Acesso em: 5 de Julho de 2023.

KILIAN, M. Streptococcus and enterococcus: pharyngitis, scarlet fever; skin and soft tissue infections; streptococcal toxic shock syndrome; pneumonia; meningitis; urinary tract infections; rheumatic fever; post-streptococcal glomerulonephritis. In: GREENWOOD, D.; BARER, M.; SLACK, R.; IRVING, W. (ed.) **Medical Microbiology**. 18ª edição. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2012, p. 183 – 198.

KILPER-BALZ, R.; SCHLEIFER, K. H. Nucleic acid hybridization and cell wall composition studies of pyogenic streptococci. **FEMS Microbiology Letters**, v. 24, 1984, p. 355 – 364. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01334.x>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

KLITGAARD, K.; BOYE, M.; CAPION, N.; JENSEN, T. K. Evidence of multiple *Treponema* phylotypes involved in bovine digital dermatitis as shown by 16S rRNA gene analysis and fluorescence in situ hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00670-08>. Acesso em: 20 de Maio de 2023.

KOH, T. H.; RAHMAN, N. B. A.; SESSIONS, O. M. Comparative genomics analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae*, an occasional cause of zoonotic infection. **Pathology**, v. 52, n. 2, 2020, p. 262 – 266. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.09.016>. Acesso em: 19 de Junho de 2023.

KOH T. H.; SNG, L-H.; YUEN, S. M.; THOMAS, C. K.; TAN, P. L.; TAN, S. H.; WONG, N. S. Streptococcal Cellulitis Following Preparation of Fresh Raw Seafood. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n°4, 2009, p. 206-208. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01213.x>. Acesso em: 27 de Maio de 2023.

KOHLER, T.; XIA, G.; KULAUZOVIC, E.; PESCHEL, A. Teichoic acids, lipoteichoic acids and related cell wall glycompolymers of Gram-positive bacteria. In: MORAN, A. P.; HOLST, O.; BRENNAN, P. J.; VON ITZSTEIN, M. (ed.). **Microbial Glicobiology: structures, relevance, and applications**. 1ª edição. Burlington: Elsevier, 2009, p. 75-91.

KOIVULA, M.; PITKALA, A.; PYAORALA, S.; MANTYSARI, E. A. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. **Acta Agriculturae Scandinavica Animal Science**, v. 57, n. 2, 2007, p. 89–96. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09064700701488941>. Acesso em: 29 de Maio de 2023.

KRULL, *et al.* Deep sequencing analysis reveals temporal microbiota changes associated with development of bovine digital dermatitis. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.02077-14>. Acesso em: 23 de Junho de 2023.

KURBAN, *et al.* Diagnosing intramammary infection: meta-analysis and mapping review on frequency and udder health relevance of microorganism species isolated from bovine milk samples. **Animals**, v. 12, n. 23, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani12233288>. Acesso em: 23 de Junho de 2023.

LAMM, C. G.; FERGUSON, A. C.; LEHENBAUER, T. W.; LOVE, B. C. Streptococcal infection in dogs: a retrospective study of 393 cases. **Diagnostic Pathology**, v. 47, n. 3, 2010, p. 387 – 395. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0300985809359601>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, v. 57, 1933, p. 571– 595. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.57.4.571>. Acesso em: 28 de Maio de 2023.

- LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G. C.; *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, 2017, p. 1261 – 1269. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001100011>. Acesso em: 6 de Julho de 2023.
- LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; *et al.* Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 13, n. 12, 2011, p. 1059 – 1065. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011001200004>. Acesso em: 19 de Junho de 2023.
- LAUS, F.; *et al.* Clinical and epidemiological investigation of chronic upper respiratory diseases caused by beta-haemolytic Streptococci in horses. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 7, 2007, p. 247 - 260. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.02.003>. Acesso em: 23 de Junho de 2023.
- LEFENBURE, T.; STANHOPE, M. J. Evolution of the core and pan-genome of Streptococcus: positive selection, recombination, and genome composition. **Genome Biology**, v. 8, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r71>. Acesso em: 01 de Junho de 2023.
- LEITNER, E., *et al.* Prevalence of emm types and antimicrobial susceptibility of Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis in Austria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, 2015, p. 918–924. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.10.001>. Acesso em 26 de Maio de 2023.
- LI, S.; *et al.* Gut microbiota and immune Modulatory Properties of Human Breast Milk *Streptococcus salivarius* e *S. parasanguinis* strains. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022, p. 1 – 17. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.798403>. Acesso em: 1 de Junho de 2023.
- LIMA, S. F.; BICALHO, M. L. S.; BICALHO, R. C. The *Bos taurus* maternal microbiome: Role in determining the progeny early-life upper respiratory tract microbiome and health. **Plos One**, v. 14, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208014>. Acesso em: 3 de Junho de 2023.
- LINDEMAN, C. J.; *et al.* Susceptibility to antimicrobial agents among bovine mastitis pathogens isolated from North American dairy cattle, 2002-2010. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 5, 2013, p. 581 – 591. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1040638713498085>. Acesso em: 27 de Junho de 2023.
- LO, H. H.; NIEN, H. H.; CHENG, Y. Y.; SU, F. Y. Antibiotic susceptibility pattern and erythromycin resistance mechanisms in beta-hemolytic group G Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis isolates from central Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 48, 2015, p. 613–617. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.003>. Acesso em: 28 de Maio de 2023.

LU B.; FANG Y.; HUANG, L.; DIAO, B.; DU, X.; KAN, B, et al. Molecular characterization and antibiotic resistance of clinical *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* in Beijing, China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, 2016, p. 119-125. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.030>. Acesso em: 30 de Maio de 2023.

LUDWIG, W.; et. al. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. **Electrophoresis**, v. 19, 1998, p. 554 – 568. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1002/elps.1150190416>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.

LUNDBERG, A.; NYMAN, A.K.; ASPAN, A.; BORJESSON, S.; UNNERSTAD, H. E.; WALLER, K. P. Udder infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis* at calving in dairy herds with suboptimal udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 99, 2015, p. 2102 – 2117. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9487>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.

LUNDBERG, A.; NYMAN, A. K.; UNNERSTAD, H. E.; WALER, K. P. Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0080-0>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.

LUNHA, K.; CHUMPOL, W.; SAMNGAMNIM, S.; et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from diseases pigs in Thailand, 2018-2020. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030410>. Acesso em: 9 de Julho de 2023.

MATAJIRA, Carlos Emilio Cabrera. Análise comparativa de genomas de estirpes de *Streptococcus suis* isoladas de suínos no Brasil. São Paulo, 2019, 108 p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-18012021-101329/publico/Carlos_Emilio_Cabrera_Matajira_original.pdf. Acesso em: 14 de Junho de 2023.

MATAJIRA, C. E.; MORENO, L. Z.; GOMES, V. T., et al. Evaluation of protein spectra cluster analysis for *Streptococcus* spp. identification from various swine clinical samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, 2017, p.245–249. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1040638716686641>. Acesso em: 29 de Maio de 2023.

MCEWAN, S.A.; FEDORKA-CLAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, 2002, p. S93 – 106. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/340246>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.

MCGREGOR, K. F., et. al. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* representing most known emm types and distinctions among subpopulation genetic structures. **Journal of Bacteriology**, 2004, v.186, p. 4285–

4294. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.186.13.4285-4294.2004>. Acesso em: 28 de Maio de 2023.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *International Journal of Food Microbiology*, v. 56, n. 1, 200, p. 21 – 28. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00227-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00227-0). Acesso em: 14 de Junho de 2023.

MCNEILLY, C. L.; MCMILLAN, D. J. Horizontal gene transfer and recombination in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, 2014, p. 676. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00676>. Acesso em: 25 de Maio de 2023.

MIONI, M. D. S. R.; CASTRO, F.F.C.; MORENO, L.Z.; *et al.* Septicemia due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* in vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Sci Rep*, v. 8, 2018, n° 9772. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28061-1>. Acesso em: 28 de Maio de 2023.

MOLLOY, E. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; MITCHELL, D. A.; ROSS, R. P. Streptolysin S-like virulence factors: the continuing *sagA*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, 2011, p. 670 – 681. Disponível em: <https://doi.org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1038/nrmicro2624>. Acesso em: 31 de maio de 2023.

MORENO L. Z.; DA COSTA, B. L.; MATAJIRA, C. E.; GOMES, V. T.; MESQUITA, R. E.; SILVA, A. P.; MORENO, A. M. Molecular and antimicrobial susceptibility profiling of *Streptococcus dysgalactiae* isolated from swine. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 86, 2016a, p.178–180. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.020>. Acesso em: 25 de Maio de 2023.

MORENO, L. Z.; MATAJIRA, C. E. C.; GOMES, V. T. M.; *et al.* Molecular and antimicrobial susceptibility profiling of atypical *Streptococcus* species from porcine clinical specimens. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 44, 2016b, p. 376 – 381. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.045>. Acesso em: 7 de Julho de 2023.

MORICONI, M.; ACKE, E.; PETRELLI, D.; PREZIUSO, S. Multiplex PCR - based identification of *Streptococcus canis*, *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus dysgalactiae* subspecies for dogs. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 50, 2017, p. 48 – 53. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.11.011>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

MOURÃO, Roberto Martins. **Causas de descarte de matrizes suínas criadas em sistema tecnificado no Distrito Federal**. Brasília, 2021, 26 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. Disponível em:

https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/43054/1/2021_RobertoMartinsMour%C3%A3o.pdf. Acesso em: 23 de Junho de 2023.

MUSKENS, J.; VAN MAANEN, C.; MARS, M. H. Dairy cows with mastitis: *Coxiella burnetti* test results in uterine, blood, and bulk milk samples. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 1-2, 2011, p. 186 – 189. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.041>. Acesso em: 22 de Junho de 2023.

NATHAN, B.; PILLAI, V.; AYYAN, S. M.; ANUUSHA, S. S.; RAJU, K. N. J. P. *Streptococcus dysgalactiae* Infection Presenting with Septic Shock. **Cureus**, v. 13, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.7759/cureus.12465>. Acesso em: 25 de Maio de 2023.

NEDBALCOVA, K.; KUCHAROVICOVA, I.; ZOUHAROVA, M.; et al. Resistance of *Streptococcus suis* isolates from the Czech Republic during 2018-2022. **Antibiotics**, v. 11, n. 9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091214>. Acesso em: 9 de Julho de 2023.

NISHIKI, I.; YOSHIDA, T.; FUJIWARA, A. Complete genome sequence and characterization of virulence genes in Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* isolated from farmed amberjack (*Seriola dumerili*). **Microbiology and immunology**, v. 63, n. 7, 2019, p. 243 – 250. Disponível em: <https://doi.org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1111/1348-0421.12716>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.

NOMOTO, R.; KAGAWA, H.; YOSHIDA, T. Partial sequence of *sodA* gene and its application to identification of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Dysgalactiae* isolated from farmed fish. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n.1, 2008, p. 95-100. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02272.x>. Acesso em: 28 de Maio de 2023.

NOMOTO, R.; UNOSE, N.; SHIMAHARA, Y.; et al. Characterization of Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* isolated from farmed fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 29, n. 11, 2006, p. 673 – 682. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1365-2761.2006.00763.x>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

OKWUMABUA, O.; O'CONNOR, M.; SHULL, E. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, 2003, p. 79–84. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2003.tb11501.x>. Acesso em: 24 de Maio de 2023.

OLIVER, S. P.; PIGHETTI, G. M. Mastitis pathogens/ environmental pathogens. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; ROGINSKI, H. (ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 1ª edição, Cambridge: Academic Press, 2002, p. 1728 - 1734.

OLIVEIRA, C. S. F.; et al. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, n. 3-4, 2015, p.

297 – 305. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.001>. Acesso em: 16 de Junho de 2023.

OLIVEIRA, R. P.; *et al.* Bovine mastitis in northeastern Brazil: occurrence of emergent bacteria and their phenotypic and genotypic profile of antimicrobial resistance. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 85, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101802>. Acesso em: 16 de Junho de 2023.

OPPEGARD, O.; *et al.* Streptococcus dysgalactiae bloodstream infections, Norway, 1999 – 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, 2023, p. 26 – 267. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2902.221218>. Acesso em: 21 de Junho de 2023.

ORDELL, A.; *et al.* A longitudinal cohort study of acute puerperal metritis cases in Swedish dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0257-9>. Acesso em: 23 de Junho de 2023.

PARK, M. J.; *et al.* Streptococcus dysgalactiae Subspecies Dysgalactiae Infection after Total Knee Arthroplasty: A Case Report. **The Journal of Korean Knee Society**, 2012, p. 120-123. Disponível em: <https://doi.org/10.5792/ksrr.2012.24.2.120>. Acesso em: 28 de Maio de 2023.

PATTERSON, M. J. Streptococcus. In: BARON S. (ed.). **Medical Microbiology**. 4ª edição. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611>. Acesso em: 12 de Junho de 2023.

PETERS, T. M. Pulsed-Field Electrophoresis for Molecular Epidemiology of Food Pathogens. In: CAUGANT, D. A. (ed.). **Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols**. 1ª edição, Humana Totowa: Humana Press, 2009, p. 59 – 70.

PETERSEN, L. M.; *et al.* Third-Generation Sequencing in the clinical laboratory: Exploring the advantages and challenges of Nanopore sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 1, 2019, p. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.01315-19>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.

POOR, A. P.; *et al.* Vaginal microbiota signatures in healthy and purulent vulvar discharge sows. **Scientific Reports**, v. 12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13090-8>. Acesso em: 3 de Junho de 2023.

PORCELLATO, D.; *et al.* Whole genome sequencing reveals possible host species adaptation of *Streptococcus dysgalactiae*. **Scientific Reports**, v. 11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96710-z>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.

PORTER, R. S.; KAPLAN, J. L. Infectious Diseases: Bacteria and Antibacterial

Drugs. In: **Merck manual of diagnosis and therapy**. 19th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011, p. 1313 – 1352.

PROCOP, G. W.; *et. al.* Gram-positive cocci Part II: Streptococci, Enterococci, and the “Streptococcus-like” bacteria. In: PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L.; HALL, G. S.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; SCHRENCKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. (aut.) **Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 7. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017.

QUINN P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. E. The Streptococci ad related cocci. In: QUINN P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. E (aut.). **Clinical Veterinary Microbiology**. 3 edição, Barcelona: Mosby, 1999, p. 127 – 136.

RATO M. G.; BEXIGA, R.; FLORINDO, C.; CAVACO, L. M., VILELA, C. L.; SANTOS-SANCHES, I. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n°34, 2013, p. 286–294. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.043>. Acesso em 28 de Maio de 2023.

REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 6, 2003, p. 651 - 658. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000600001>. Acesso em: 6 de Julho de 2023.

RENTZHAMMER, R.; *et. al.* Detection of various *Streptococcus* spp. and their antimicrobial resistance patterns in clinical specimens from Austrian swine stocks. **Antibiotics**, v. 9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120893>. Acesso em: 19 de Junho de 2023.

REYNOSO-GARCIA, J.; *et. al.* A Complete guide to human microbiomes: body niches, transmission, development, dysbiosis and restoration. **Frontiers in Systems Biology**, v. 2, 2022, p. 1 – 22. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsysb.2022.951403>. Acesso em: 1 de Junho de 2023.

RHOUMA, M.; SOUFI, S.; CENATUS, S.; ARCHAMBAULT, M.; BUTAYE, P. Current insights regarding the role of farm animals in the spread of antimicrobial resistance from a one health perspective. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci9090480>. Acesso em: 12 de Junho de 2023.

RIDLER A.; HICKSON, R.; GRIFFITHS, K.; PETTIGREW, E.; KENYON, P. Effects of *Streptococcus dysgalactiae* polyarthritis on lamb growth and mortality and risk factors for disease. **Small Rumin. Res.**, v. 177, 2019, p. 25-28. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.06.008> . Acesso em: 25 de Maio de 2023.

RIFFON, R.; *et. al.* Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**,

v. 39, n. 7, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.39.7.2584-2589.2001>. Acesso em: 12 de Junho de 2023.

ROJO-BEZARES, B.; *et. al.* *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* from invasive and non-invasive infections in Spain: combining epidemiology, molecular characterization, and genetic diversity. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 40, 2021, p. 1031 – 1021. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10096-020-04119-9>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.

ROSENBACH, F. J. **Mikroorganismen bei den Wundinfektionskrankheiten des Menschen**. Wiesbaden: J.F. Bergmann Verlag, 1884.

RYAN, D. P.; ROTHWELL, J. T.; HORNITSKY, M. A. Z. *Streptococcus dysgalactiae* infection in calves. **Aust Vet J**, v. 68, 1991, p.210. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1991.tb03196.x> . Acesso em: 28 de Maio de 2023.

SALINA, A.; *et. al.* Importância da diferenciação dos *Streptococcus agalactiae* e não *agalactiae* nas mastites. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 1, 2017, p. 209 – 215.

SANTOS, P. R. *et. al.* Resistance profile and biofilm production of *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Streptococcus* spp. from dairy farms in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 54, 2023, p. 1217 – 1229. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s42770-023-00929-z>. Acesso em: 16 de Junho de 2023.

SANTACROCE, L.; *et. al.* The Human Respiratory System and its Microbiome at a Glimpse. **Biology**, v. 9, n. 10, 2020, p. 1 – 16. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology9100318>. Acesso em: 1 de Junho de 2023.

SCHRIEBER, L.; TOWERS, R.; MUSCATELLO, G.; SPEARE, R. Transmission of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* between child and dog an Aboriginal Australian Community. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, n. 2, 2014, p. 145 – 148. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1111/zph.12057>. Acesso em: 19 de Junho de 2023.

SCHULTHESS, B.; *et. al.* Identification of gram-positive cocci by use of matrix - assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.02654-12>. Acesso em: 16 de Junho de 2023.

SCHWARZ, S.; *et. al.* Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.

65, n. 4, 2010, p. 601 – 601. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkq037>. Acesso em: 15 de Junho de 2023.

SEGURA, M.; ARAGON, V.; BROCKMEIER, S. L.; et al. Update on *Streptococcus suis* research and prevention in the era of antimicrobial restriction: 4th international workshop on *S. suis*. *Pathogens*, v. 9, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens9050374>. Acesso em: 7 de Julho de 2023.

SENTAUSA, E.; FOURNIER, P. E. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 9, 2013, p. 790 – 795. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12181>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.

SHEN, *et al.* Antimicrobial Resistance and Virulence Factor of *Streptococcus dysgalactiae* isolated from Clinical Bovine Mastitis Cases in Northwest China. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, 2021, p. 3519-3530. Disponível em: [10.2147/IDR.S327924](https://doi.org/10.2147/IDR.S327924). Acesso em: 25 de Maio de 2023.

SHERLEY, M.; GORDON, D.M.; COLLIGNON, P.J. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.150, 2004, p.1539-1546.

SHERMAN, J. M. The streptococci. **Bacteriology Reviews**, nº 1, v. 3, 1937, p. 97. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/br.1.1.3-97.1937>. Acesso em: 23 de Maio de 2023.

SILVA, C. A.; *et al.* Microbiota anaeróbia isolada de bovinos com pododermatite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09351999000300001> . Acesso em: 23 de Junho de 2023.

SILVA, L. G.; GENTELUCI, G. L.; CORREA DE MATTOS, M.; GLATTHARDT, T.; SÁ, A. M. F. et al. Group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in south-east Brazil: genetic diversity, resistance profile and the first report of human and equine isolates belonging to the same multilocus sequence typing lineage. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, 2015; p. 551–55. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000052>. Acesso em: 22 de Maio de 2023.

SMISTAD, M.; *et al.* *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* in Norwegian bovine dairy herds: Risk factors, sources and genomic diversity. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 4, 2022, p. 3574 – 3587. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21471>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.

SOARES, T. C. S.; PAES, A. C.; MEGID, J.; *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from clinically healthy swine in Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 2, 2014, p. 145 – 149.

SOUTO, L. I. M.; *et al.* Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. **Journal of Dairy Research**, v. 77, 2010, p. 63 – 70. Disponível em:

<https://doi.org/10.1017/S0022029909990409>. Acesso em: 16 de Junho de 2023.

SOUZA JR., J. P.; SANTOS, A. R.; DE PAULA, G. R.; BARROS, R. R. Antimicrobial susceptibility and genetic relationships among *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* isolates in Rio de Janeiro. **Infectious Diseases**, v. 48, n. 9, 2016, p. 676 – 681. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1080/23744235.2016.1192680>. Acesso em: 5 de Junho de 2023.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 5, n. 4, 1992, p. 387 - 399. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.5.4.387>. Acesso em: 6 de Julho de 2023.

STEINBERG, R. S.; *et al.* Changes in bovine milk bacterial microbiome from healthy and subclinical mastitis affected animals of the Girolando, Gyr, Guzera, and Holstein breeds. **International Microbiology**, v. 25, 2022, p. 803 – 815. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10123-022-00267-4>. Acesso em: 3 de Junho de 2023.

SWEDBERG, G.; RINGERTZ, S.; SKOLD, O. Sulfonamide resistance in *Streptococcus pyogenes* is associated with differences in the amino acid sequence of its chromosomal dihydropteroate synthase. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 42, 1998, p. 1062–1067. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aac.42.5.1062>. Acesso em: 23 de Maio de 2023.

TABER, H. W.; MUELLER, J. P.; MILLER, P. F.; ARROW, A. S. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 4, 1987, p. 439 – 457. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mr.51.4.439-457.1987>. Acesso em: 22 de Junho de 2023.

TAGG, J.; WESCOMBE, P.; BURTON, J. Genus *Lactococcus*. In: VON WRIGHT, A.; SEPPO, S.; OUWEHAND, A. C.; LAHTINEN, S.(ed.). **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 4ª edição, Boca Raton: CRC Press, 2012, p. 63 – 77.

TAKAHASHI, T.; *et al.* Clinical aspects of invasive infection with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in elderly patients. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 16, 2010, p. 68 – 71. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0016-1>. Acesso em: 23 de Junho de 2023.

TAPONEN, S.; LISKI, E.; HEIKKILA, A. M.; PYORALA, S. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, v. 100, 2016, p. 493 – 503. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11465>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.

- TEIXEIRA, L. M.; PINTO, T. C. A.; MERQUIOR, V. L. C. *Streptococcus*, *Enterococcus* e Gênero Relacionado. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (ed.). **Microbiologia**. 6ª edição, São Paulo: Atheneu, 2015, p. 195 – 200.
- TETTELIN, H.; FELDBLYUM, T. Bacterial Genome Sequencing. In: CAUGANT, D. A. (ed.). **Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols**. 1ª edição, Humana Totowa: Humana Press, 2009, p. 231 – 248.
- TIAN X. Y.; ZHENG, N.; Han, R. W., et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Streptococcus* isolated from dairy cows with mastitis in China. **Microbial Pathogenesis**, v. 31, 2019, p. 33–39. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.035>. Acesso em: 25 de Maio de 2023.
- TIBAYRENC, M. Microbial Molecular Epidemiology: an Overview. In: CAUGANT, D. A. (ed.). **Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols**. 1ª edição, Humana Totowa: Humana Press, 2009, p. 1 – 12.
- TIMONEY, J. F. *Streptococcus*. In: GYLES C. L.; PRESCOT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. (ed.) **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4ª edição. Ames: Wiley-Blackwell, 2010, p. 51 – 74.
- TIMONEY, J. F. The Pathogenic equine streptococci. **Veterinary Research**, v. 35, 2004, p. 397-409. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/vetres:2004025>. Acesso em: 25 de Maio de 2023.
- TIMONEY, J. F. The Streptococci and Related Cocci. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. 3ª edição. Maryland Heights: Mosby, 1999, p. 127 – 136.
- TORRES, R. S. L. A.; et. al. An Outbreak of *Streptococcus dysgalactiae* subsp *Equisimilis* in a Hospital in the South of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, 2007, p. 417-420. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300006>. Acesso em: 25 de Maio de 2023.
- ULSENHEIMER, B. C.; et. al. Perfil de suscetibilidade e casuística do *Streptococcus dysgalactiae* em mastites na região Noroeste do Estado do RS. **PUBVET**, v. 14, n. 9, 2020, p. 1 – 6. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n9a643.1-6>. Acesso em: 12 de Junho de 2023.
- URUEN, C.; GARCIA, C.; FRAILE, L., et al. How *Streptococcus suis* escapes antibiotic treatments. **Veterinary Research**, v. 53, 2022. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s13567-022-01111-3>. Acesso em: 7 de Julho de 2023.
- VAN BELKUM, A.; et. al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 3, 2007, p. 1 – 46. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>. Acesso em: 14 de Junho de 2023.

- VAN BROECKEL, T. P.; *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **PNAS**, v. 112, n. 18, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>. Acesso em: 12 de Junho de 2023.
- VANDAMME P.; POT, B.; FALSEN, E.; KERSTERS, K.; DEVRIESE, L. A. Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, 1996, p. 774 –781. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-46-3-774>. Acesso em: 24 de Maio de 2023.
- VELA, A. I., *et al.* Neonatal mortality in puppies due to bacteremia by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, 2006, p. 666–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.44.2.666-668.2006> . Acesso em: 22 de Maio de 2023.
- VELEZ, J. R.; *et al.* Whole-genome sequence analysis of antimicrobial resistance genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* isolates from Canadian dairy herds. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00063>. Acesso em: 6 de Junho de 2023.
- VERMAN, D.; GARG, P. K.; DUBEY, A. K. Insights into the human oral microbiome. **Archives of Microbiology**, v. 200, 2018, p. 525 – 540. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00203-018-1505-3>. Acesso em: 1 de Junho de 2023.
- VIEIRA V. V., *et al.* Genetic relationships among the different phenotypes of *Streptococcus dysgalactiae* strains. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, 1998, p. 1231–43. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1231>. Acesso em: 23 de Maio de 2023.
- WANG, C.; WEI, S.; CHEN, N.; XIANG, Y.; WANG, Y.; JIN, M. Characteristics of gut microbiota in pigs with different breeds, growth periods and genders. **Microbial technology**, v. 15, n.3, 2022, p. 793 – 804. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13755>. Acesso em: 3 de Junho de 2023.
- WANG, S. M.; DEIGHTON, M. A.; CAPSTICK, J. A.; GERRATY, N. Epidemiological typing of bovine streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. **Epidemiology and Infection**, v. 123, 1999, p. 317 – 324.
- WENTE, N.; KROMKER, V. *Streptococcus dysgalactiae* – Contagious or Environmental? **Animals**, v. 10, n. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10112185>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.
- WOODS R.; ROSS, R.F. Immunogenicity of experimental *Streptococcus equisimilis* vaccines in swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, 1977, p.33 –36.

WOUDSTRA, S.; *et al.* Strain diversity and infection durations of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. Causing intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 106, 2022, p. 4214 – 4231. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22942>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.

WU, Z. Antimicrobial use in food animal production: situation analysis and contributing factors. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, v. 5, n. 3, 2018. Disponível em: [10.15302/J-FASE-2018207](https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018207). Acesso em: 12 de Junho de 2023.

XU, S.; *et al.* Comparative genomic analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* isolated from bovine mastitis in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.751863>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.

YANG, W.; LI, A. Isolation and Characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. **Aquaculture**, v. 294, n° 1-2, 2009, p. 14-17. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.018>. Acesso em: 22 de Maio de 2023.

YANG, Y.; *et al.* Susceptibility breakpoint for Danofloxacin against swine *Escherichia coli*. **BMC Veterinary Research**, v. 15, 2019. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s12917-019-1783-2>. Acesso em: 22 de Junho de 2023.

YONGKIETTRAKUL, S.; MANEERAT, K.; ARECHANAJAN, B.; *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from deceased pigs, asymptomatic pigs, and human patients in Thailand. **BMC Veterinary Research**, v. 15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1732-5>. Acesso em: 7 de Julho de 2023.

ZADOKS, R. N.; *et al.* Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance in humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, 2011, p. 357 – 352. Disponível em: <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10911-011-9236-y>. Acesso em: 16 de Junho de 2023.

ZAOUTIS, T.; ATTIA, M.; GROSS, R.; KLEIN, J. The role of group C and group G streptococci in acute pharyngitis in children. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.1, 2004, p.37-40. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00732.x> . Acesso em: 29 de Maio de 2023.

ZHANG S. Y.; PIEPERS, S.; SHAN, R., *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n° 4, 2018, p. 3344–3355. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14031>. Acesso em: 2 de Junho de 2023.

ZHU, Y.; *et. al.* Nasopharyngeal microbiomes in donkeys shedding *Streptococcus equi* subspecies *equi* in comparison to healthy donkeys. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.645627>. Acesso em: 3 de Junho de 2023.

ZORIC, M.; NILSSON, E.; LUNDEHEIM, N.; WALLGREN, P. Incidence of lameness and abrasion in piglets in identical farrowing pens with four different types of floor. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-23>. Acesso em: 23 de Junho de 2023.

ZORIC M.; SJOLUND, M; PERSSON, M.; NILSSON, E.; LUNDEHEIM, N.; WALLGREN, P. Lameness in piglets. Abrasions in nursing piglets and transfer of protection towards infections with Streptococci from sow to offspring. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, n° 6, 2004, p. 278–284. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00777.x>. Acesso em: 13 de Junho de 2023.